

Untersuchungen der Blut-Hoden-  
Schranke während der Rekrudescenz  
der Spermatogenese  
nach Downregulation mittels eines  
slow release GnRH-Implantates beim  
Rüden:

Expression von Connexin 43,  
Occludin, Claudin-3, -5 und -11

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Aus dem Klinikum Veterinärmedizin

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Axel Wehrend

Untersuchungen der Blut-Hoden-Schranke während der Rekrudeszenz  
der Spermatogenese nach Downregulation mittels eines GnRH-  
Implantates beim Rüden:

Expression von Connexin 43, Occludin, Claudin-3, -5 und -11

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Lena Röhrs  
Tierärztin aus Mainz

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Axel Wehrend

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Bergmann

Tag der Disputation: 11.11.2013

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

*Lena Röhrs*

**Meinen Eltern**

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse wurden zum Teil in folgender Publikation veröffentlicht:

**RÖHRS L, WALLRABENSTEIN S, WEHREND A, FIETZ D, BREHM R, FAILING K GOERICKE-PESCH S. 2013:**

Investigations on the blood-testis barrier during recrudescence of spermatogenesis following downregulation using a slow release GnRH agonist implants in the dog. Reprod Biol. 2013, 13, Suppl 2, 34 [46. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 38. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung und 2. Deutsch-Polnische Gemeinschaftstagung, Danzig, 27.02.-01.03-2013]





## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Literaturübersicht .....</b>	<b>12</b>
2.1 Endokrine Regulation der Spermatogenese .....	12
2.1.1 Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) .....	14
2.1.2 Gonadotropine .....	15
2.1.3 Testosteron .....	17
2.2 Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren.....	17
2.3 Anatomie und Funktion des Hodens .....	20
2.3.1 Tubuli seminiferi.....	20
2.3.2 Spermatogenese .....	21
2.3.3 Staging der Spermatogenese .....	24
2.3.4 Die Sertoli-Zelle .....	26
2.3.4.1 Entwicklung der Sertoli-Zelle.....	27
2.3.4.2 Funktion und Eigenschaften der adulten Sertoli-Zelle .....	28
2.3.4.3 Differenzierungsmarker .....	32
2.4 Zell-zu-Zell-Verbindungen .....	35
2.4.1 Tight-Junctions .....	36
2.4.1.1 Morphologie und Funktion.....	36
2.4.1.2 Molekularer Aufbau .....	38
2.4.1.3 Tight-Junctions im Hoden .....	39
2.4.2 Gap-Junctions.....	48
2.4.2.1 Aufbau und Funktion .....	48
2.4.2.2 Connexone.....	49
2.4.2.3 Connexine .....	51
2.4.2.4 Lebenszyklus der Gap-Junctions .....	56
2.4.2.5 Öffnungszustand der Gap-Junctions.....	58
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>60</b>
3.1 Material/Gewebe .....	60
3.2 Sertoli-Zellkerngröße.....	62
3.2.1 Vimentin-Färbung der Sertoli-Zellen.....	62
3.2.2 Messung der Sertoli-Zellkerne .....	62
3.3 Western-Blot zur Überprüfung der Spezifität des für die Immunhistochemie verwendeten Primärantikörpers .....	63
3.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus dem Gewebe .....	63
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	64
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) – Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht .....	64
3.3.4 Elektroblothing – Transfer der Proteine auf eine Membran .....	66
3.3.5 Ponceau-Färbung .....	67
3.3.6 Nachweisreaktion .....	67
3.4 Immunhistochemie .....	69
3.4.1 Anfertigung der Gewebeschnitte .....	69
3.4.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll .....	69
3.4.3 Auswertung der Immunhistochemie .....	72

3.4.3.1 Binarisierung .....	72
3.4.3.2 Grauwertanalyse .....	75
3.4.3.3 Deskriptive Auswertung .....	75
3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion .....	76
3.5.1 Isolierung von RNA aus Hodengewebe .....	76
3.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	77
3.5.3 DNase-Behandlung .....	77
3.5.4 Reverse Transkription.....	78
3.5.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	79
3.5.6 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten .....	82
3.5.7 Sequenzierung von PCR-Produkten.....	83
3.6 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (Real time RT-PCR oder qPCR) .....	84
3.6.1 Vorbereitung der Proben .....	84
3.6.2 Primer-Herstellung.....	84
3.6.3 Prinzip der SYBR Green qPCR .....	84
3.6.4 Etablierung der Standardkurve und Ermittlung der Effizienz der qPCR ....	85
3.6.5 Durchführung der SYBR Green qPCR .....	87
3.6.6 Auswertung der qPCR-Ergebnisse.....	87
3.7 Statistische Auswertung .....	88
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>90</b>
4.1 Messung der Sertoli-Zellkerngröße .....	90
4.1 Expression auf mRNA-Ebene .....	93
4.1.1 Ergebnisse der RT-PCR .....	93
4.1.1.1 Gap-Junction Protein Connexin43 .....	93
4.1.1.2 Tight-Junction Proteine .....	94
4.1.1.2.2 Claudin-3 .....	95
4.1.2 Ergebnisse der qPCR .....	97
4.1.2.1 Gap-Junction Protein Cx43 .....	97
4.1.2.2 Tight-Junction Proteine .....	100
4.1.3 Ergebnisse der Sequenzierung aller verwendeten Primer-Paare.....	110
4.2 Expression von Connexin 43 auf Proteinebene .....	111
4.2.1 Western Blot .....	111
4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen.....	112
4.2.2.1 Auswertung der stagespezifischen Färbung .....	116
4.2.2.2 Binarisierung .....	117
4.2.2.3 Grauwertanalyse .....	120
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>122</b>
5.1 Diskussion der Methodik .....	122
5.1.2 Angewendetes Modell .....	122
5.1.3 Ausmessung der Fläche der Sertoli-Zellkerne.....	123
5.1.4 Western-Blot .....	123
5.1.4 Immunhistochemie.....	124
5.1.5 Nachweis von mRNA.....	125
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	125
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>135</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>138</b>
<b>A. Anhang .....</b>	<b>140</b>
A.1 Stoffe und Reagenzien .....	140
A.2 Verbrauchsmaterialien .....	142
A.3 Verwendete Geräte .....	143

A.4 Software.....	144
A.5 Puffer und Lösungen.....	146
A.5.1 Proteinextraktion und Western-Blot.....	146
A.5.2 Immunhistochemie .....	151
A.5.3 RNA-Isolierung und PCR .....	153
<b>B. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>154</b>
<b>C. Danksagung .....</b>	<b>176</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Neuroendokriner Regelkreis beim männlichen Säugetier .....	13
Abb. 2 Zell-Zell Verbindungen in Epithel- und Endothelzellen .....	35
Abb. 3 Modelle der Paarung einzelner Tight-Junction-Stränge .....	44
Abb. 4 Schematische Darstellung von Gap-Junction Kanäle .....	51
Abb. 5 Lebenszyklus der Connexine .....	58
Abb. 6 Beispielhafte Darstellung der Binarisierungs-Schritte mittels ImageTool: .....	74
Abb. 7 Fläche der Sertoli-Zellkerne in $\mu\text{m}^2$ , Gruppenmittelwerte ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) .....	92
Abb. 8 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Connexin 43 (Cx43) und GAPDH mittels RT-PCR .....	94
Abb. 9 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Occludin (OCLN) und GAPDH mittels RT-PCR .....	94
Abb. 10 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Claudin-3 (CLDN-3) und GAPDH mittels RT-PCR .....	95
Abb. 11 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Claudin-5 (CLDN-5) und GAPDH mittels RT-PCR .....	96
Abb. 12 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Claudin-11 (CLDN-11) und GAPDH mittels RT-PCR .....	96
Abb. 13 Ratio der mRNA-Expression von Connexin43, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)] .....	99
Abb. 14 Ratio der mRNA-Expression von Occludin, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)] .....	102
Abb. 15 Ratio der mRNA-Expression von Claudin-3, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)] .....	104
Abb. 16 Ratio der mRNA-Expression von Claudin-5, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)] .....	107
Abb. 17 Ratio der mRNA-Expression von Claudin-5, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)] .....	109
Abb. 18 Western Blot für Connexin43 .....	111
Abb. 19 Immunhistochemischer Nachweis des caninen Cx43-Proteins .....	113
Abb. 20 Immunhistochemischer Nachweis von Connexin43, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke im Tubulus (PIA) in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin- Transformation .....	119
Abb. 21 Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins, mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) .....	121

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Hunde nach histologischen Kriterien der am weitesten entwickelten Keimzellen („Developmental Groups“(DG)).....	61
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Hunde nach Kastrationszeitpunkt.....	61
Tabelle 3: Kontrollgruppen.....	61
Tabelle 4: DNase-Mix pro Einfachansatz.....	77
Tabelle 5: RT-Mix pro Einfach- bzw. 6-fach-Ansatz.....	78
Tabelle 6: Zusammensetzung Prä-Mix für RT-PCR .....	79
Tabelle 7: Zusammensetzung Primer-Mix für RT-PCR .....	79
Tabelle 8: Verwendete hundespezifische Primersequenzen .....	81
Tabelle 9: qPCR-Mix pro Ansatz/Well.....	85
Tabelle 10: Effizienzen der Primerpaare.....	86
Tabelle 11: Fläche der Sertoli-Zellkerne in $\mu\text{m}^2$ , Gruppenmittelwerte ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).....	91
Tabelle 12: Ratio der mRNA-Expression von Cx43, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)].....	98
Tabelle 13: Ratio der mRNA-Expression von Occludin, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)].....	101
Tabelle 14: Ratio der mRNA-Expression von Claudin-3, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)].....	103
Tabelle 15: Ratio der mRNA-Expression von Claudin-5, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)].....	106
Tabelle 16: Ratio der mRNA-Expression von Claudin-11, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$ (SF)].....	108
Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis von Connexin43, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke im Tubulus (PIA) in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation.....	118
Tabelle 18: Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins, mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) .....	120

### Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ABP	Andogenbindendes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AJ	Adherend Junctions
AMH	Anti Müller Hormon
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AR	Androgenrezeptor
Arg	Arginin
Bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
BTB	Blut-Hoden-Schranke (blood-testis barrier)
bzw	beziehungsweise
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CG	Controll Group (adulte Hundekontrollgruppe)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLDN	Claudin
C(t)	crossing time
Cx43	Connexin 43
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DG	Developmental Group
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

DS	Desmosomen
E	Effizienz
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ES	Endoplasmatic spezializations
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GJ	Gap Junction
GJA	Gap Junction der Subgruppe alpha
GJIC	Gap Junctional intercellular Communication
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
G-Protein	guanine nucleotide binding protein
h	Stunde
hCx	humanes Connexin
His	Histidin
HKG	Housekeeping Gen
ICC-Puffer	ImmunoCytoChemistry-Puffer
IP3	Inositoltrisphosphat
JAM	Junctional Adheasions Molecule
JG	Juvenil Group (juvenile Hundegruppe)
K	Kalium
kDa	kilo Dalton
KO	knockout
Leu	Leucin
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
m	Meter
m	Steigung der Gerade
mA	milli Ampere
MAGUK	Membran-assozierte Guanylat Kinasen
mg	milligramm
min	Minute

MIK	Mullerian-Inhibiting-Faktor
MIS	Mullerian-Inhibiting Substance
MIQ	Minimum Information for Publication of quantitative real-time PCR Experiments
ml	Milliliter
mM	millimolar
MnCl	Manganchlorid
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na	Natrium
ng	nanogramm
nm	nanometer
OCLN	Occludin
OSP	Oligodendrocyte specific Protein
NTC	No Template Control
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline Tween-20
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDZ	Post synaptic density95/SA90, Sepate junction-Protein Discs large, Tight Junction- Protein Zonula occludentes-1
PG	Profact Group (Hunde mit Profact®-Depot Implantat)
pmol	picomol
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Real Time Polymerase-Ketten- Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCO	Sertoli-Cell only
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate



Ser	Serin
SF	Streufaktor
SG	Suprelorin Group (Hunde mit Suprelorin®-Implantat)
SHBG	Sex-Hormon-bindendes Globulin
s.o.	siehe oben
SRY	Sex detreminierende Region des Y-Chromosomes
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetrametylethylendiamin
TER	Transepithelialer Widerstand
TJ	Tight-Junction
TMVCK	Transmembran Protein deleted in velocardiofacial syndrome
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose Faktor alpha
Tris HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
$\mu$ g	microgramm
$\mu$ l	microliter
$\mu$ m	micrometer
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wo	Wochengruppe
$\bar{x}$	Mittelwert
$\bar{x}_g$	geometrischer Mittelwert
ZO	Zonula Occludens
°C	Grad Celsius

### 1. Einleitung und Fragestellung

Für den physiologischen Ablauf und die Aufrechterhaltung der Spermatogenese sind verschiedene Faktoren von essentieller Bedeutung: Einer dieser Faktoren ist die Integrität der Blut-Hoden-Schranke (blood-testis-barrier/BTB). Hierbei handelt es sich um eine hochdynamische Struktur, die durch ständigen Auf- und Abbau die Migration der Keimzellen innerhalb der Tubuli seminiferi des Hodens ermöglicht, aber dennoch die Aufrechterhaltung des für die Spermatogenese wichtigen Mikromilieus gewährleistet (Dym und Fawcett, 1970). Gebildet wird die BTB durch Adherens-, Tight- und Gap-Junctions (Dym und Fawcett, 1970; Mruk und Cheng, 2004; Wong und Cheng, 2005; Cheng und Mruk, 2009), die durch die Ausbildung von Zellkontakten im basolateralen Bereich der Sertoli-Zellen eine Passagebehinderung zwischen dem Kreislaufsystem und dem Inneren der Tubuli seminiferi darstellen. Dies ist die Voraussetzung für die beiden Hauptfunktionen der BTB: die Erzeugung und Aufrechterhaltung eines spezifischen Milieus für Meiose und Spermio-genese und die physikalische Separation der haploiden und somit antigenen Keimzellen vom eigenen Immunsystem (Johnson, 1970a, b).

Die im Bereich der BTB vorherrschenden Zellkontakte stellen sowohl die undurchlässigen Tight-Junctions (TJ), als auch die zur interzellulären Kommunikation befähigten kanalförmigen Gap-Junctions (GJ) dar. Durch die Ausbildung von TJ kommt es zu einer Reihe von Kontakten der Plasmamembran benachbarter Zellen, was zur Obliteration des interzellulären Raumes in diesem Bereich führt. Dies ermöglicht die Ausbildung einer Barriere für den parazellulären Transport. Die Grundstruktur der TJ bilden neben Occludin (OCLN) die Claudine (CLDN), eine Familie bestehend aus 24 Mitgliedern (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Beide stellen integrale Membranproteine dar, die über den Kontakt zu benachbarten Zellenmembranen TJ ausbilden. Im Hodengewebe konnten sowohl OCLN als auch CLDN-Proteine, hier vor allem CLDN-3, -5 und -11 im basalen Bereich der Sertoli-Zellen detektiert werden (Morrow et al., 2010).

GJ stellen im Gegensatz zu den rein mechanischen TJ kommunizierende Zellkontakte dar, welche sich aus jeweils 2 Halbkanälen (Connexone) zusammensetzen. Diese sind wiederum aus 6 Proteinuntereinheiten, den Connexinen (Cx) aufgebaut. Auch innerhalb der Cx-Familie kommt je nach Spezies eine unterschiedliche Anzahl von Isoformen vor. Aktuell sind bei der Maus 20 und

beim Mensch 21 verschiedene Cx bekannt (Söhl und Willecke, 2004). Im Hund konnten bislang nur 5 verschiedene Isoformen nachgewiesen werden (Cruciani und Mikalsen, 2005). Speziell im Hoden spielen GJ und deren Cx neben der Möglichkeit der direkten Zell-zu-Zell-Kommunikation über die Regulation der terminalen Differenzierung der Sertoli-Zellen und der damit verbundenen Kontrolle über die Entwicklung der Keimzellen auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Spermatogenese. Cx43 wird im testikulären Gewebe zwischen Sertoli-Zellen, zwischen Sertoli-Zellen und Spermatogonien und zwischen Sertoli-Zellen und primären Spermatozyten exprimiert sowie in den interstitiellen Leydig-Zellen (Decrouy et al., 2004; Rüttinger et al., 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Blut-Hoden-Schranke anhand der Expression von OCLN, CLDN-3, -5, -11 und Cx43 während der Rekrudescenz der Spermatogenese nach Downregulation infolge eines slow release GnRH-Agonist-Implantates beim Rüden zu charakterisieren. Infolge der Anwendung eines slow release GnRH-Agonist-Implantates kommt es nach initialer Stimulation zur Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren, was in der reversiblen Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion resultiert. Nach Wirkende bzw. Implantatentfernung kommt es vom Arrest der Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien und Spermatozyten zum Wiederanlaufen (Rekrudescenz) und schließlich histomorphologisch zum intakten Keimepithel mit vollständiger Spermatogenese. Neben der Expression der BTB während der Rekrudescenz ist von Interesse, inwieweit die morphologischen und molekularbiologischen Gegebenheiten der BTB im downregulierten caninen Hoden mit denen saisonaler Tiere vergleichbar sind und inwieweit downregulierte Hoden der juvenilen und der Hoden mit wiedereingesetzter vollständiger Spermatogenese und dem unbehandelten adulten Rüden Parallelen aufweisen.

Hierzu erfolgte eine Größenbestimmung der Sertoli-Zellkerne sowie die Untersuchung von OCLN, CLDN-3, -5, -11 und Cx43 auf mRNA-Ebene mittels qualitativer und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Zeitpunkt der Downregulation und während der Rekrudescenz vergleichend am juvenilen und unbehandelten caninen Hoden. Der Nachweis von Cx43 erfolgte weiterhin auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) und Westernblot (WB).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Endokrine Regulation der Spermatogenese

Die Regulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion erfolgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse (Smith, 1930).

Demnach sind die endokrine und germinative Funktion des adulten Hodens, d.h. die Testosteronsekretion und die Spermatogenese, abhängig von der Stimulation durch die hypophysären Gonadotropine, Follikel-stimulierendes (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). Die Sekretion von FSH und LH in der Adenohypophyse wird durch das vom Hypothalamus pulsatil freigesetzte Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH) induziert.

Unter LH-Einfluss wird die adulte Leydig-Zelle zur Produktion von Testosteron angeregt, ein essentielles Hormon für die Aufnahme und Aufrechterhaltung der Spermatogenese (Roberts und Zirkin, 1991). Testosteron wirkt über Androgenrezeptoren (AR) die auf Sertoli-, Leydig- und peritubulären Zellen (Nakhla et al., 1984; Vornberger et al., 1994; Pelletier, 2000), aber nach allgemeiner Meinung nicht auf Keimzellen lokalisiert sind (Lyon et al., 1975; Anthony et al., 1989; Shan et al., 1997; Zhou et al., 2002; Walker und Cheng, 2005). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass jeglicher Effekt von Testosteron auf die Keimzellen, über die Kommunikation mit den Sertoli-Zellen vermittelt wird (Johnston et al., 2001).

FSH wirkt über spezifische G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren, die ausschließlich auf Sertoli-Zellen exprimiert werden (McLachlan et al., 2002). Die Bedeutung von FSH für die Spermatogenese liegt v.a. präpubertär in der Regulation der Proliferation der Sertoli-Zellen und damit in der Regulation der Hodengröße und der spermatogenen Kapazität des Hodens (Heckert und Griswold, 2002). An Mäusen mit Hypogonadismus konnte gezeigt werden, dass unter kompletter Abwesenheit von Gonadotropinen und alleinigem Einfluss von Testosteron eine qualitativ, aber nicht quantitativ vollständige Spermatogenese abläuft. Obwohl das Verhältnis von Keimzellen zu Sertoli-Zellen normal war, erreichten die hypogonadalen Mäuse im Hinblick auf die Hodengröße und Anzahl von Keim- und Sertoli-Zellen nur 40% der Werte normaler, nicht hypogonadaler Mäuse (Singh und Handelsman, 1996).

Die Steuerung der Ausschüttung der einzelnen Hormone wird über verschiedene Feedback-Mechanismen geregelt. So wirken sowohl die Gonadotropine, als auch die

gonadalen Sexualsteroiden ab einem bestimmten Schwellenwert hemmend auf die GnRH-Ausschüttung des Hypothalamus (Döcke, 1994). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Produktion von Inhibin. Diese findet in den Sertoli-Zellen statt, wird durch FSH selbst stimuliert und führt seinerseits wiederum zu einer selektiven Hemmung der FSH-Ausschüttung aus der Adenohypophyse, was sich in einer negativen Korrelation der beiden Hormone im Blutplasma zeigt (Hoffmann, 2003).

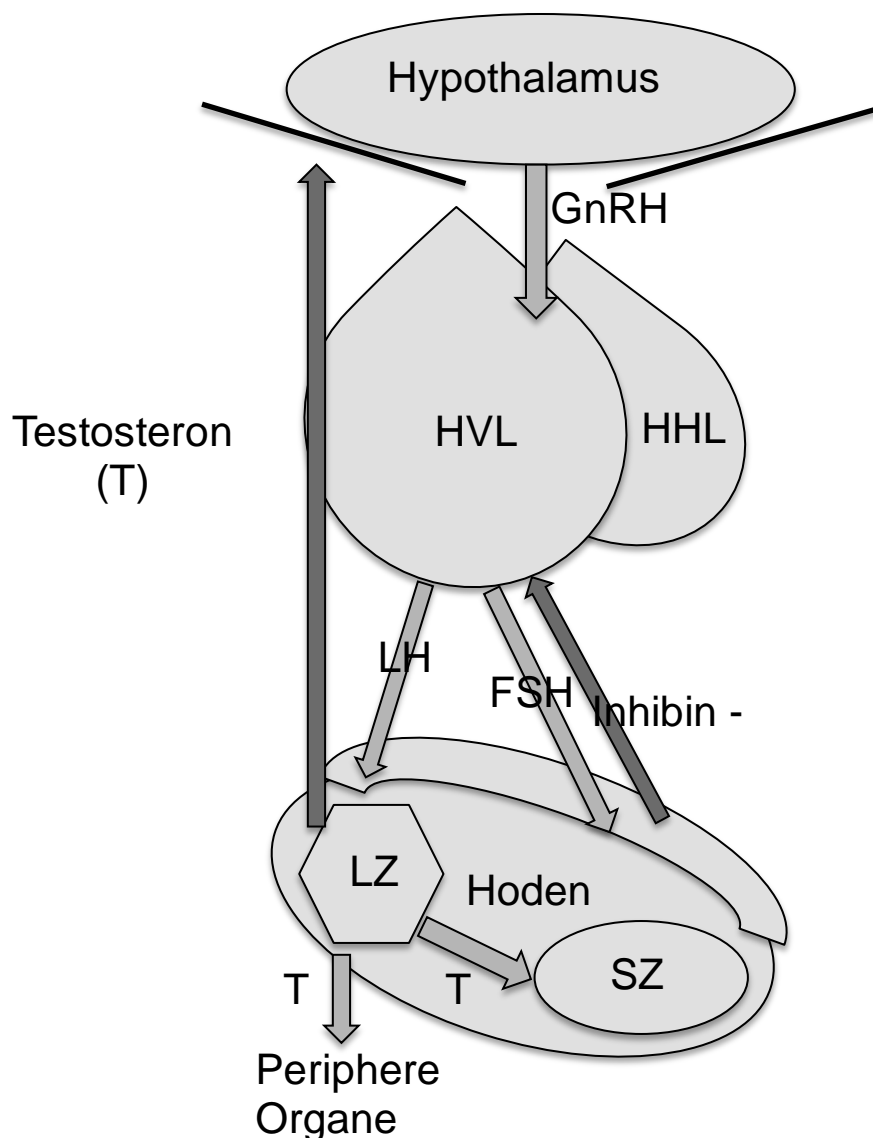


Abb. 1 Neuroendokriner Regelkreis beim männlichen Säugetier; HVL: Hypophysenvorderlappen; HHL: Hypophysenhinterlappen; LZ: Leydig-Zelle; SZ: Sertoli-Zelle

### 2.1.1 Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)

GnRH wird im Gehirn im Hypothalamus gebildet und stellt ein Schlüsselhormon in der Regulation der Reproduktion bei Säugetieren dar. GnRH ist ein Dekapeptid, das aus folgender Aminosäuresequenz besteht: (pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>8</sub> (Schally et al., 1971). Es wird pulsatil in das Hypothalamus-Hypophysen-Portal-System abgegeben und so zur Adenohypophyse transportiert (Carmel et al., 1976; König und Liebich, 2005). Da aufgrund seiner kurzen biologischen Halbwertszeit von 2-4 Minuten die Konzentration im peripheren Blut nicht quantitativ bestimmt werden kann (Aurich und Töpfer-Petersen, 2005), müssen aufgrund des identischen, aber zeitlich versetzten Sekretionsmusters indirekte Rückschlüsse über die Messung von LH und FSH gezogen werden. So konnten Günzel-Apel et al. (1990) gemessen an der LH-Konzentration im peripheren Blut von Beagle-Rüden verschiedenen Alters eine Pulsfrequenz von im Mittel 4,5 Pulsen pro 6 Stunden ermitteln (Günzel-Apel et al., 1990), beim Bullen konnte eine Pulsfrequenz von 6 LH-Pulsen in 24 Stunden nachgewiesen werden (Stumpf et al., 1993).

An den gonadotropen Zellen der Adenohypophyse wirkt GnRH über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der aus 7 transmembranären Domänen aufgebaut ist. Je nach Art des gekoppelten G-Proteins können im nächsten Schritt sowohl die Adenylatcyclase, als auch die Phospholipase C stimuliert werden, was die Aktivierung von second messengern, wie dem zyklischen AMP (cAMP), Diacylglycerin (DAG) und Inositol-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), zur Folge hat. Durch die auf diese Weise induzierte Mobilisation von Ca<sup>2+</sup> wird eine schnelle Stimulation der exozytotischen Gonadotropinsekretion vermittelt (Bourguignon et al., 1987; Naor, 1990, 2009; Armstrong et al., 2011). FSH und LH werden ins Blut sezerniert, über das Kreislaufsystem zu den Gonaden transportiert und stimulieren hier die Produktion der Sexualsteroiden. Im männlichen Organismus kommt es über die Rückkopplung von Testosteron bzw. dessen Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) oder Östradiol zur Hemmung der Gonadotropinsekretion sowohl auf hypothalamischer, als auch auf hypophysärer Ebene. Neben der Freisetzung und Produktion der Gonadotropine beeinflusst GnRH auch seine eigene Wirksamkeit. Durch einen temporären Anstieg der Plasmakonzentration in der hypophysären Portalvene wird die Anzahl der GnRH-Rezeptoren auf den gonadotropen Zellen

erhöht und es kommt zu einer Anreicherung der Sekretgranula innerhalb der Zellen (Döcke, 1994).

### 2.1.2 Gonadotropine

Die beiden Gonadotropine LH und FSH, sind Glykoproteine, die in den basophilen Zellen der Adenohypophyse gebildet werden. Diese Zellen werden als gonadotrope Zellen bezeichnet. LH liegt hier in zwei Formen vor. Zum einen als „Speicherpool“ und zum anderen als „schnell freisetzbarer Pool“ (Döcke, 1994). FSH hingegen wird nicht wie LH in den gonadotropen Zellen gespeichert, sondern entsprechend der Syntheseaktivität der Zellen konstitutiv sezerniert und in das Blut abgegeben; daher zeigt FSH im Gegensatz zu LH eine geringere Abhängigkeit von GnRH (Millar, 2005). Glykopeptid-Hormone bestehen aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Hierbei stellt die  $\alpha$ -Kette eine gemeinsame Untereinheit dar, die bei allen Glykoprotein-Hormonen gleich aufgebaut ist, wohingegen die  $\beta$ -Untereinheit hormonspezifische Eigenschaften aufweist (Pierce und Parsons, 1981; Döcke, 1994).

Die Bedeutung der hypophysären Gonadotropine für die Gonaden beruht auf der Entwicklung morphologischer Strukturen, auf der Aufrechterhaltung der germinativen Gonadenfunktion und Regulation der inkretorischen Aktivität (Döcke, 1994).

Obwohl GnRH die Freisetzung von LH und FSH stimuliert, zeigt sich aufgrund unterschiedlicher Ansprechbarkeit auf die Änderung der GnRH-Impulse sowie durch den hemmenden Effekt gonadaler Steroid- und Peptidhormone auf LH und FSH ein asynchrones Sekretionsmuster. Eine weitere Rolle spielt die unterschiedliche Halbwertszeit der beiden Gonadotropine (Millar, 2005).

Hierbei stimuliert LH nach seiner Freisetzung über die Bindung an LH-Rezeptoren auf den interstitiellen Leydig-Zellen die Produktion und Freisetzung von Testosteron, weshalb es auch als Interstitial-cell-stimulating-hormone (ICSH) bezeichnet wird (Döcke, 1994). In einer Studie an LH-Rezeptor knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass LH nur indirekt über die Regulation der Testosteronsynthese im adulten Hoden die Spermatogenese beeinflusst, da bei diesen Mäusen nach exogener Testosterongabe der Ablauf einer vollständigen Spermatogenese initiiert werden konnte (Lei et al., 2001).

Die in verschiedenen Studien ermittelten LH-Konzentrationen im peripheren Blut männlicher Hunde zeigen große Unterschiede und variieren nicht nur zwischen den

Veröffentlichungen der verschiedenen Autoren, sondern auch innerhalb der Studien deutlich, was sich durch das von Günzel-Apel et al. (1990) beschriebene, pulsatile Sekretionsmuster von LH erklären lässt. So schwanken die Konzentrationen zwischen 0,2 bis 12 ng/ml (DePalatis et al., 1978) bzw. 1,2 bis 96 ng/ml (Günzel-Apel et al., 1990) während Knol et. al. (1993) mittlere Konzentrationen von  $4,6 \pm 0,5$  ng/ml angeben.

FSH bindet über FSH-Rezeptoren direkt an die Sertoli-Zellen (Orth und Christensen, 1978; Simoni et al., 1997) und kontrolliert so präpubertär deren Proliferation und damit Größe und Spermienkapazität des Hodens (Heckert und Griswold, 2002). Die Sertoli-Zelle spielt aufgrund ihrer verschiedenen Aufgaben, als Stützgerüst des Keimepithels (Liebich, 1999), als Nährstoffproduzent (Sharpe, 2005), als zelluläre Komponente der Blut-Hoden-Schranke (Dym und Cavicchia, 1977) sowie als limitierende Komponente für die Keimzellanzahl (Orth et al., 1988), eine zentrale Rolle in der Spermatogenese. Die Funktion von FSH auf die Spermatogenese wird demnach indirekt über die parakrinen Signale der Sertoli-Zelle vermittelt (Silber, 2000). Zwar ist die FSH-Stimulation nicht obligatorisch für die Erhaltung der Spermatogenese, da Testosteron alleine eine vollständige Spermatogenese aufrecht erhalten kann (Srinath et al., 1983; Marshall et al., 1986), dennoch ist eine maximale Spermienproduktion nur bei einer kombinierten Stimulation von LH und FSH möglich (Steinberger, 1971; Nieschlag et al., 1999). Aravindan et al. (1993) stellten in einer Studie an einer gegen FSH immunisierten Gruppe von Affen eine Reduktion der runden Spermatiden um 65%, der elongierten Spermatiden um 52% und der Spermienzahl im Ejakulat um 80% fest.

Durch die pulsatile Abgabe von GnRH in die hypophysäre portale Zirkulation (Clarke und Cummins, 1982) und die daraus folgende intermittierende Stimulation der gonadotropen Zellen findet die Regulation der FSH- und LH-Sekretion statt (Belchetz et al., 1978). Das von den Sertoli-Zellen produzierte, testikuläre Inhibin stellt einen weiteren regulierenden Faktor für die FSH-Freisetzung dar. Inhibin ist ein Antagonist zu Aktivin (Xu et al., 1995) und unterdrückt die FSH-Sekretion über die Antagonisierung der konstitutiven Aktivinexpression (Xu et al., 1995; Lebrun und Vale, 1997).



### 2.1.3 Testosteron

Das Steroidhormon Testosteron ist ein Androgen, das aus Cholesterol gebildet wird. Testosteron wirkt im Hoden über spezielle AR, die in den Sertoli-, Leydig- und den peritubulären Zellen exprimiert werden, aber nach Meinung zahlreicher Autoren im adulten Hoden auf den Keimzellen selbst nicht vorkommen (Lyon et al., 1975; Anthony et al., 1989; Shan et al., 1997; Zhou et al., 2002; Walker und Cheng, 2005). Die stärkste Wirksamkeit unter den natürlichen Androgenen zeigen Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron, wobei 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron im Vergleich zu Testosteron eine 2-5fach höhere Affinität zum AR hat und somit die stärkere androgene Potenz aufweist (Wilbert et al., 1983; Grino et al., 1990). Testosteron wird durch die Stimulation von LH in den Leydig-Zellen des Hodens produziert (Amann und Schanbacher, 1983; Keeney und Ewing, 1990), jedem LH-Peak folgt demnach ein Testosteron-Gipfel (DePalatis et al., 1978; Günzel-Apel et al., 1990).

Im männlichen Organismus erfüllen die Androgene eine Reihe von Aufgaben: So sind sie in der Fetalphase am Descensus testis beteiligt, beeinflussen im adulten Organismus die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale und sind ein essentieller Bestandteil in der Steuerung und Regulation der Spermatogenese (Wilson et al., 1980; Hoffmann, 2003; Wang et al., 2009). Für die bei Hunden gemessenen Testosteronwerte werden je nach Autor folgende Konzentrationsbereiche angegeben: 0,4 – 6,0 ng/ml (DePalatis et al., 1978), 0,08 – 16 ng/ml (Günzel-Apel et al., 1990), 1,5 – 6,5 ng/ml (Koch et al., 2006) und  $4,0 \pm 2,1$  ng/ml (Riesenbeck et al., 2002)

### 2.2 Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren

Die Kastration des Rüden ist in der Veterinärmedizin zur Routine-Operation geworden und stellt einen der häufigsten chirurgischen Eingriffe in der Praxis dar. Als Alternative zur klassischen, chirurgischen Kastration und den damit verbundenen Risiken und möglichen Nebenwirkungen wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden einer hormonellen Kastration entwickelt. Im Folgenden soll hier die Wirkweise der seit 2007 verfügbaren slow release GnRH-Agonist-Implantate näher dargestellt werden

GnRH wirkt über die Bindung an spezielle GnRH-Oberflächenrezeptoren der gonadotropen Zellen der Adenohypophyse. Diese Rezeptoren gehören zu der Gruppe der 7 Transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Byrne et al., 1998) (siehe Abschnitt 2.1.1), welche in der Regel über die Ligandenbindung am C-terminalen Ende phosphoryliert und somit desensibilisiert sowie internalisiert werden (Ferguson und Caron, 1998; Gainetdinov et al., 2004). Der GnRH-Rezeptor Typ I der Säuger ist der einzige G-Protein gekoppelte Rezeptor, welchem das C-terminale Ende fehlt. Dies führt dazu, dass keine Phosphorylierung an dieser Stelle möglich ist und somit der GnRH-Rezeptor der Säuger im Vergleich zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine außergewöhnlich langsame Internalisierung zeigt (Heding et al., 1998; Willars et al., 1999; Finch et al., 2009). Diese Desensibilisierung bzw. Internalisierung der Rezeptoren findet nach einer von der physiologischerweise pulsatilen Ausschüttung von GnRH abweichenden dauerhaften Stimulation der Rezeptoren mit einem Agonisten statt und stellt einen Feedback-Mechanismus als Antwort auf eine kontinuierliche Stimulation des Rezeptors dar (Ferguson und Caron, 1998; Gainetdinov et al., 2004). Die Abnahme der durch den Rezeptor vermittelten Effekte wird als „Down-Regulation“ bezeichnet und findet durch die Anwendung von slow release GnRH-Analoga-Implantaten Einsatz in der Veterinär- und Humanmedizin. Da die Halbwertszeit des natürlichen GnRH's relativ kurz ist (Pimstone et al., 1977; Bennett und McMartin, 1978; Handelsman und Swerdloff, 1986), werden in der Medizin synthetisch hergestellte GnRH-Analoga verwendet. Hierbei werden durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz des nativen GnRH Analoga hergestellt, die sowohl eine hohe Affinität zum Rezeptor aufweisen als auch durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Peptidasen (Coy et al., 1976) eine verlängerte Halbwertszeit (>2h) zeigen.

Nach der Verabreichung von slow release GnRH-Agonist-Implantaten zum Zweck der gonadalen Suppression kommt es initial zu einem Anstieg der Gonadotropine und der gonadalen Hormone, welche das Einsetzen der Suppression in Abhängigkeit vom Wirkstoff verzögern (Herbst, 2003).

Der Einsatz von GnRH-Analoga zur hormonellen Kastration beim Rüden wurde bereits 1984 von Vickery et al. (1984) untersucht. Hierbei zeigte sich nach täglicher Injektion von 10 µg/kg D-Na(2)6-LHRH bei Beagle-Rüden eine initiale Erhöhung der Plasmakonzentration von LH, FSH und Testosteron. Das Basalniveau von LH und Testosteron war nach 4 Behandlungstagen erreicht. Bereits nach 2-wöchiger

Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtspermienzahl und nach 5 Wochen war keine Ejakulatgewinnung mehr möglich. Histologisch zeigte sich eine komplette Suppression der Spermatogenese nach 38 Behandlungstagen. Den Status der Downregulation der germinativen Hodenfunktion charakterisieren Dubé et al. (1987) nach Behandlung mit [D-Trp6] GnRH Ethylamide in Übereinstimmung mit Riesenbeck et al. (2002) und Goericke-Pesch et al. (2009) als Arrest der Spermatogenese vor allem auf Ebene der Spermatogonien, da nur noch vereinzelt Spermatozyten nachweisbar waren. Dies führte zu einer Reduktion des Hodengewichts um 64%. Alle durch die Behandlung induzierten Effekte waren vollständig reversibel, wobei die Dauer bis zur Wiederherstellung der Ausgangssituation abhängig von der Behandlungsdauer war (Vickery et al., 1984; Dubé et al., 1987).

Die heute eingesetzten slow release GnRH-Agonist-Implantate zeichnen sich durch eine langsame kontinuierliche Freisetzung des GnRH-Agonisten aus und stellen eine effektive und reversible Alternative zur chirurgischen Kastration dar. Die Beobachtungen, die mit Buserelinacetat (Profact® Depot) (Riesenbeck et al., 2002; Goericke-Pesch et al., 2010a), Azagly-Nafarelin (Gonazon®) (Ludwig et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2010b) und Deslorelin (Suprelorin®) (Trigg et al., 2001; Junaidi et al., 2003; Junaidi et al., 2007; Junaidi et al., 2009) gemacht wurden, entsprechen prinzipiell den frühen Beobachtungen, dass die Applikation zu einer reversiblen Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion führt, jedoch wurden gewisse Variationen in Abhängigkeit vom Wirkstoff beobachtet. Detaillierte Daten zur Rekrudescenz der Spermatogenese liegen auf Ejakulatebene sowie auf histologischer Ebene vor (Junaidi et al., 2003; Ludwig et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2011), wobei große individuelle Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese auffallen (Goericke-Pesch et al., 2009). In Europa ist derzeit nur für den Rüden ein GnRH-Agonist-Implantat (Suprelorin® Deslorelin 4,7 mg bzw. 9,4 mg) der Firma Virbac Tierarzneimittel GmbH zur temporären Unterdrückung der Fortpflanzung bei adulten Rüden durch die European Medicines Agency (EMA) zugelassen und verfügbar.

### 2.3 Anatomie und Funktion des Hodens

Der Hoden (griech. Orchis, lat. Testis, Didymus) ist ein paarig angelegtes Organ, welches beim männlichen Tier der Bildung der Keimzellen und der Androgenproduktion dient.

Die Lage des Hodens ist tierartlich unterschiedlich. Beim Rüden liegen die Hoden weit kaudal im Zwischenschenkelspalt und weisen eine für den Fleischfresser typische, annähernd kugelige Form auf (Gasse, 2004). Bei dem zeitlich gesehen speziesspezifischen Abstieg der Hoden (Descensus testis), der beim Rüden meist erst mit Erreichen des 1. Lebensmonats vollständig abgeschlossen ist, wandern diese vom Ort der embryonalen Anlage kaudal der Niere durch den Leistenkanal in den Hodensack (Scrotum) außerhalb der Bauchhöhle (Cavum abdominalis). Trotz der extraabdominalen Lage ist der Hoden von Peritoneum überzogen und hat somit über den Processus vaginalis eine Verbindung zur Bauchhöhle. Diese Lamina visceralis liegt dem Hoden direkt auf und ist mit der bindegewebigen Tunica albuginea testis verwachsen, welche als derbe Bindegewebskapsel das Hodenparenchym unter Druck hält. Von dieser ausgehend ziehen Blutgefäße und Nerven enthaltende Bindegewebssepten, Septula testis, in das Hodeninnere und unterteilen so das Parenchym in kleine Lobuli, welche beim Hund im Gegensatz zum Menschen jedoch nur gering ausgebildet sind (Russell et al., 1990c; Liebich, 1999; Gasse, 2004).

Im Inneren kann der Hoden in 2 Hauptabschnitte unterteilt werden: das tubuläre Kompartiment, welches aus den Tubuli seminiferi besteht, die der Bildung der männlichen Keimzellen dienen und das interstitielle Kompartiment, welches die Samenkanälchen umgibt, die Blut- und Lymphgefäße sowie insbesondere die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen beinhaltet (Russell et al., 1990c).

#### 2.3.1 Tubuli seminiferi

Die Tubuli seminiferi liegen als Tubuli seminiferi contorti in stark gewundener Form vor und setzen sich aus einer Wand, der Lamina propria, und dem Keimepithel zusammen. Die Samenkanälchen haben insgesamt einen Durchmesser von 180 bis 250 µm (Holstein et al., 2003; Bergmann, 2005). Jeweils 2 bis 5 Samenkanälchen werden von einem pyramidenförmigen Hodenläppchen eingeschlossen (Liebich,

1999). Die Tubuli seminiferi contorti weisen je nach Spezies deutliche Unterschiede in der Gesamtlänge auf. So beträgt die Gesamtlänge beim Rüden durchschnittlich ca. 150 m, beim Mann ca. 250 m und beim Mäusebock ca. 2 m (Bascom und Osterud, 1925).

Im weiteren Verlauf nehmen die Tubuli recti die in den Tubuli seminiferi contorti produzierten Samenzellen auf und stellen eine Verbindung zum Rete testis her. Am Caput testis bilden sich aus dem Rete testis die Ductuli efferentes, welche die Gewebekapsel des Hodens durchbrechen und den Nebenhodenkopf bilden (Gasse, 2004).

Die Tubuli seminiferi selbst sind durch eine 4- bis 5-lagige, ca. 8 µm dicke Gewebeschicht, die Tunica propria, begrenzt (Holstein et al., 2003; Bergmann, 2005), die sich hauptsächlich aus Myoidzellen und kollagenen Fasern zusammensetzt und zu beiden Seiten von einer Basalmembran umgeben ist (Connell und Christensen, 1975; Bergmann, 2005).

Das Keimepithel liegt der Tunica propria nach innen an. Es ist aufgebaut aus einer Basalmembran und den somatischen Sertoli-Zellen, in deren Zytoplasmaausläufern die verschiedenen Stadien der Keimzellen eingebettet sind, und hat beim Mensch eine Höhe von ca. 80 µm (Holstein et al., 2003; Bergmann, 2005).

Die Entwicklung der Keimzellen bis zur Abgabe als elongierte Spermatide in das Tubuluslumen findet in engem räumlichen Kontakt zu den Sertoli-Zellen statt, welche Nähr- und Stützfunktion übernehmen.

### 2.3.2 Spermatogenese

Als Spermatogenese wird der Prozess bezeichnet, bei dem sich aus diploiden männlichen Keimzellen durch Meiose möglichst kontinuierlich eine Vielzahl von befruchtungsfähigen haploiden Spermatozoen bilden.

Die Spermatogenese findet im Keimepithel der Tubuli seminiferi an der Oberfläche der somatischen Sertoli-Zellen statt und kann funktionell in drei Phasen unterteilt werden (Clermont, 1972; Russell et al., 1990c; Steger, 2001):

1. die Proliferations- oder mitotische Vermehrungsphase (Spermatogonien)
2. die meiotische Vermehrungsphase (Spermatozyten)
3. Differenzierungsphase oder Spermiogenese

Um die Leistungsfähigkeit der Spermatogenese messen zu können, werden die pro Tag produzierten Spermien mit dem Gewicht der Hodenmasse in Gramm ins Verhältnis gesetzt. Dies variiert speziesspezifisch in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand und Alter des Individuums, der Jahreszeit und dem Anteil an Sertoli- und Leydig-Zellen (Johnson, 1995).

Die Stammzellen der Spermatogenese sind die Spermatogonien, deren Differenzierung im Tubulus räumlich gesehen entlang der Oberfläche der Sertoli-Zellen von basal nach apikal verläuft (Brehm und Steger 2005). Es können 3 Typen von Spermatogonien unterschieden werden: Die Stammzellspermatogonien, die proliferativen Spermatogonien und die differenzierenden Spermatogonien (Russell et al., 1990c). Eine andere Form der Einteilung kann aufgrund ihrer Kernmorphologie vorgenommen werden. Hierbei werden die Spermatogonien in Typ A („pale“ und „dark“) und Typ B Spermatogonien unterteilt (Roosen-Runge und Barlow, 1953; Clermont, 1966; Rowley et al., 1971). Die Typ A Spermatogonien, welche in die Gruppe der undifferenzierten Spermatogonien (Stammzell- und proliferative Spermatogonien) eingeordnet werden, liegen der Basalmembran auf und bilden einen lebenslangen Pool von Stammzellen. Diese unreifen Zellen durchlaufen zahlreiche Mitosen, ein Teil differenziert sich über das Stadium der intermediären Spermatogonie schließlich zu Typ B Spermatogonien, welche zur Gruppe der differenzierten Spermatogonien zählen (Russell et al., 1990c). Der andere Teil erneuert den Bestand an A-Spermatogonien, um eine kontinuierliche Spermienproduktion sicherzustellen. Um dies zu gewährleisten, sind die Stammzellspermatogonien im Gegensatz zu anderen Keimzellstadien relativ resistent gegenüber verschiedenen Noxen (Dym und Clermont, 1970). Bei der Weiterentwicklung der Spermatogonien kann beobachtet werden, dass die verschiedenen Keimzellstadien, welche sich aus einer gemeinsamen Spermatogonie entwickeln, über interzelluläre Brücken miteinander verbunden bleiben. Über die Kanäle der Interzellularbrücken findet eine Kommunikation zwischen den einzelnen Zellklonen statt, was eine synchrone Entwicklung bis zur Spermiation zur Folge hat (Fawcett et al., 1959; Huckins, 1978; Weber und Russell, 1987).

In weiteren Mitosevorgängen entstehen schließlich aus den Typ B Spermatogonien die weiter lumenwärts liegenden primären Spermatozyten, die nach einer Wachstumsphase in die Meiose eintreten. Die weitere Entwicklung der primären Spermatozyten kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Die Meiose startet

mit der DNA Synthese der Typ B Spermatogonien, was als Präleptotän-Stadium bezeichnet wird. Diese unterscheiden sich mikroskopisch nur schwer von den Typ B-Spermatogonien, lediglich die Größe und die Dichte des Chromatins sowie ihre fehlende Verbindung zur Basalmembran können als Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden. Mit dem Auftreten der leptotänen Spermatozyten zeichnet sich der Beginn der Prophase der 1. Reifeteilung ab und es kommt zum Ende hin zu einer deutlichen Zunahme der Zell- und Kerngröße (Russell und Frank, 1978). Im weiteren Verlauf der Meiose können die primären Spermatozyten anhand der Chromatinstruktur in Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän unterteilt werden. (Russell et al., 1990c; Bergmann, 2006). Im leptotänen Zustand der Spermatozyten kommt es zu einer Kondensation des Chromatins und damit zur Ausbildung der sogenannten Transportform der Chromosomen. Im weiteren Verlauf lagern sich die entsprechenden maternalen und paternalen homologen Chromosomenpaare aneinander, was als Zygotän-Stadium bezeichnet wird. Im Pachytän kann es nach einer weiteren Verdichtung des Chromatins zum crossing over kommen, d.h. dem Austausch homologer Chromatiden-Abschnitte zwischen den gepaarten Chromosomen. Im Diplotän trennen sich die Chromosomenpaare mit Ausnahme der rekombinierten Stellen, die über Chiasmata noch miteinander verbunden bleiben, wieder. Die Zellen des Diplotän stellen im Epithel des Tubulus die größten Keimzellen dar (Russell und Frank, 1978). Im Anschluss an die Prophase finden die Metaphase, die Anaphase und die Telophase der ersten meiotischen Teilung statt. Im Zuge der 1. Reifeteilung (Meiose I) entstehen aus den primären Spermatozyten die sekundären Spermatozyten, die sich durch die 2. Reifeteilung (Meiose II) zu runden Spermatiden entwickeln. Die Zellgröße nimmt mit der Entwicklung von den primären Spermatozyten über die sekundären Spermatozyten hin zu den runden Spermatiden kontinuierlich ab.

Die weitere Differenzierung erfolgt durch biochemische, physiologische und morphologische Veränderungen und wird als Spermiogenese bezeichnet. Diese gliedert sich in 4 Phasen: die Golgi Phase, die Kappenphase, die akrosomale Phase und die Reifephase (Leblond und Clermont, 1952). Die Golgi-Phase ist gekennzeichnet durch die Bildung zahlreicher proakrosomaler Vesikel, die zum akrosomalen Bläschen mit einem dichten Granulum verschmelzen. Diese Vesikel wandern im weitem Verlauf an die äußere Kernmembran und flachen sich ab. In der folgenden Kappenphase stülpt sich das Bläschen über den Kern und bildet so eine

Akrosomenkappe, die den proximalen Kernbereich bedeckt. Weiterhin kommt es zu einer Verlagerung des Zytoplasmas nach distal. Die Akrosomenphase ist gekennzeichnet durch eine Abflachung und Kondensation des Zellkerns und es kommt zur Ausbildung des Akrosoms, welches die hydrolytischen Enzyme für das spätere Eindringen in die Zona pellucida der Eizelle enthält. In der abschließenden Reifephase wird die Kondensation des Zellkerns beendet (Leblond und Clermont, 1952; Russell et al., 1990c; Liebich, 1999; Bergmann, 2006). Die abschließende Reifung führt zur Ausbildung der speziesspezifischen Form des Spermiokopfes. Am Ende dieser Entwicklung stehen die elongierten Spermatiden, die in das Lumen der Tubuli seminiferi abgegeben werden, was als Spermiation bezeichnet wird (Hoffmann, 2003; Bergmann, 2006).

Die Gesamtdauer der Spermatogenese variiert speziesspezifisch (Clermont, 1972). Beim Mensch konnte eine Dauer von 64 Tagen nachgewiesen werden (Heller und Clermont, 1963), während bei der Maus die Spermatogenese spätestens nach 35 Tagen abgeschlossen ist (Oakberg, 1956). Beim Hund zeigt sich mit 62-64 Tagen eine ähnliche Zeitspanne wie beim Mensch (Foote et al., 1972; Ibach et al., 1976; Russell et al., 1990a; Soares et al., 2009).

### 2.3.3 Staging der Spermatogenese

Im histologischen Querschnitt eines Tubulus können charakteristische Gruppierungen von Keimzellen, die sich in genau festgelegten Entwicklungsphasen befinden, unterschieden werden, was als Stadium bzw. „Stage“ der Spermatogenese bezeichnet wird. Um diese Einteilung vornehmen zu können, ist eine vollständige Spermatogenese vorauszusetzen (Russell et al., 1990a). Für die Klassifizierung der einzelnen Stadien, die konventioneller Weise mit römischen Ziffern benannt werden, werden häufig die Spermatiden herangezogen. Je nach Spezies werden eine unterschiedliche Anzahl an Stadien unterschieden: 6 beim Menschen (Clermont, 1963), 12 bei der Maus und 14 bei der Ratte (Oakberg, 1956; Russell et al., 1990b; Wistuba et al., 2003; Bergmann, 2006). Beim Rüden bestehen in der Literatur verschiedene Staging Schemata. 1972 veröffentlichten Foote et al. (1972) ein Schema, bei welchem 8 Stages unterschieden werden. Die Autoren orientierten sich für die Einteilung an der Form des Nukleus der Spermatiden, der Lage der Spermatiden und Spermatozyten in Bezug auf die Basalmembran und die



Anwesenheit von meiotischen Figuren. Ibach et al. nahmen (1976) eine Einteilung der Spermatogenese des Hundes in 10 Stadien vor. Russell et al. (1990) publizierten ebenfalls ein Schema mit 8 Stages, orientierten sich bei der Einteilung aber an der Morphologie des Akrosoms sowie der Form der jüngsten Generation der Spermatiden (Foote et al., 1972; Russell et al., 1990b; Soares et al., 2009).

Da in der vorliegenden Arbeit die Einteilung nach Russell angewandt wurde, soll diese hier näher charakterisiert werden:

Charakteristisch in Stage I ist, dass noch keine Anteile des akrosomalen Vesikels nachweisbar sind sowie eine starke Ähnlichkeit der Spermatiden zu sekundären Spermatozyten vorliegt. In Stage II hingegen beginnt die Entwicklung des proakrosomalen Granulums, welches dann in Stage III in das akrosomale Vesikel wandert und sich dem Zellkern anlagert. Im weiteren Verlauf (Stage IV) flacht sich das Bläschen ab und führt damit zu einer Verformung des Kerns. Im Stage V kommt es zum Kollaps des akrosomalen Vesikels und die Spermatidengeneration zeigt wieder einen runden Kern. In Stage VI werden die Kerne der Spermatiden an die Zellmembran verlagert und die Abflachung bzw. Elongation des Kerns beginnt und wird in Stage VII fortgesetzt. Im VIII und letzten Stage der Spermatogenese treten Keimzellen der 1. und 2. Reifeteilung sowie sekundäre Spermatozyten auf (Russell et al., 1990b). Die Gesamtdauer eines Zyklus beim Hund beträgt  $13,6 \pm 0,7$  Tage (Foote et al., 1972). Verteilt man diese Gesamtdauer auf die einzelnen Stages, wurden folgenden Zeiten ermittelt: Stage I: 27,7h; Stage II: 23,8h; Stage III: 22h; Stage IV: 91,2h; Stage V: 44,1h; Stage VI: 46,7h; Stage VII: 35h; Stage VIII: 35,9h (Russell et al., 1990b).

Aufgrund der Kernmorphologie der Spermatiden und der Kernreaktivität mit periodic-acid-Schiff (PAS) kann die Spermatiden Differenzierung in weitere Stufen (Steps) unterteilt werden, welche mit arabischen Zahlen benannt werden (Russell et al., 1990a; Brehm und Steger, 2005)

Einen kompletten Ablauf der einzelnen Stadien in einem bestimmten Abschnitt des Keimepithels bezeichnet man als Zyklus der Spermatogenese (Russell et al., 1990a; Brehm und Steger, 2005). Dieser ist von der Spermatogenesewelle zu unterscheiden, die sich an einem längsgeschnittenen Tubulus als gleichzeitiges Auftreten verschiedener Zellassoziationen darstellt (Perey et al., 1961). Dabei liegt eine vollständige Spermatogenesewelle nur dann vor, wenn alle Segmente chronologisch aufeinander folgend ablaufen.

### 2.3.4 Die Sertoli-Zelle

Bei allen Säugetieren bilden die Sertoli-Zellen die somatische Grundlage der Samenkanälchen des Hodens und stellen im adulten Zustand teilungsinaktive Zellen dar. Neben der meist verwendeten Bezeichnung Sertoli-Zelle, benannt nach ihrem Erstbeschreiber Enrico Sertoli (1842-1910), werden sie auch als Nähr- (Brown, 1885), Ammen- oder Stützzellen bezeichnet (Ebner, 1888). Aus diesen unterschiedlichen Bezeichnungen können Rückschlüsse auf einen Teil der vielfältigen Funktionen der Sertoli-Zelle gezogen werden.

Die Sertoli-Zelle unterscheidet sich auf den ersten Blick vor allem durch ihre besondere Form von anderen Zellen. Sie sitzt mit einer breiten Basis der Basalmembran auf und verjüngt sich lumenwärts (Liebich, 1999). Der prominente Zellkern nimmt einen signifikant großen Teil der Basalregion der Zelle ein und ist charakterisiert durch seine gelappte Struktur und einen deutlich sichtbaren Nucleolus (Foote et al., 1972; Lebelo und van der Horst, 2010). Bedingt durch die saisonalen Veränderungen und die einzelnen Phasen des Keimepithelzyklus kann sich der Zellkern lumenwärts verschieben (Liebich, 1999).

Die fadenförmige Gestalt des Zytoplasmas der Zelle erklärt sich durch die zahlreichen Zytoplasmaausläufer und die so entstehenden Nischen in der Oberfläche, in welche die verschiedenen Stadien der Keimzellen teilweise oder vollständig eingebettet sind (Russell et al., 1983; Weber et al., 1983; Wong und Russell, 1983). Jede Sertoli-Zelle steht mit einer bestimmten Anzahl an Keimzellen in engem Kontakt, die tierartsspezifisch variieren. Diese Verbindungen sind eine Voraussetzung für die Quantität der Spermatogenese (Bergmann, 2005). Die absolute Größe der Sertoli-Zellen ist aufgrund ihrer baumartigen Verzweigungen des Zytoplasmas schwer zu ermitteln. Das Volumen beträgt durchschnittlich  $6000 \mu\text{m}^3$  mit einer Oberflächengröße von ca.  $12000 \mu\text{m}^2$  (Russell et al., 1990c). Das Volumen variiert je nach Stage und wird bei der Ratte mit einem Volumen von 5300 bis 5500  $\mu\text{m}^3$  in Stage VI bis VIII und 7700 bis 8000  $\mu\text{m}^3$  in Stage XII bis XIV angegeben (Kerr, 1988).

### 2.3.4.1 Entwicklung der Sertoli-Zelle

Die Entwicklung der Sertoli-Zelle spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Hodens. Im frühen Embryo zeigen sich noch keine Anzeichen für eine Differenzierung zum weiblichen oder männlichen Geschlecht. Erst mit dem Auftreten der prämordialen Sertoli-Zellen, die das Gen für die sex-determinierende Region (SRY) des Y-Chromosoms exprimieren (Lovell-Badge, 1993; Koopman, 1995), treten morphologische Veränderungen auf, die dazu führen, dass aus der indifferenten Gonadenanlage des Embryos eine Entwicklung zum männlichen Geschlecht hin stattfindet. Diese, als erstes histologisches Zeichen für die testikuläre Differenzierung anzusehenden Pre-Sertoli-Zellen, fördern nicht nur die Migration der primordialen Keimzellen, sondern stehen mit diesen von Beginn der Entwicklung an in engem Kontakt und verhindern deren Eintritt in die Meiose (Brehm und Steger, 2005). Auf hormoneller Ebene beeinflussen die Sertoli-Zellen die Geschlechtsdeterminierung durch die Produktion des Anti-Müller-Hormons (AMH) (Josso et al., 1993; Mackay, 2000; Josso et al., 2001), welches die Ausbildung des Müller'schen Gangs unterdrückt und somit die Entstehung von Eileiter, Uterus und Vaginaldach verhindert.

Weiterhin fördern die primordialen Sertoli-Zellen die Differenzierung und Funktion der Leydig-Zellen, welche wiederum Testosteron sezernieren und somit eine entscheidende Rolle im Hodenabstieg und in der Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale besitzen (Hutson et al., 1997; Sharpe et al., 2003).

Zu Beginn der Pubertät ist die mitotische Phase der Sertoli-Zellentwicklung abgeschlossen und die endgültige Anzahl der Sertoli-Zellen festgelegt (Brehm und Steger, 2005). Dies konnte sowohl bei der Ratte (Orth, 1982) als auch bei der Maus (Kluin et al., 1984; Vergouwen et al., 1991) nachgewiesen werden. Beim Schwein zeigte sich im Unterschied zu anderen Tieren eine zweiphasige Proliferationsphase, wobei der erste prominentere Peak im Zeitraum von der Geburt bis zum ersten Lebensmonat, die zweite Proliferationsphase im Alter von 3 bis 4 Monaten stattfindet (Franca et al., 2000), aber mit dem Beginn der Pubertät beendet war. In diesem Stadium der Entwicklung ändert sich die Rolle der Sertoli-Zelle von der Bestimmung der Geschlechtsdeterminierung hin zur Unterstützung und Regulierung der Spermatogenese (Sharpe et al., 2003).

Während der Pubertät findet der Übergang von der fetalen, der Pre-Sertoli-Zelle, zur adulten und funktionsfähigen Sertoli-Zelle statt. Dieser mehrstufige Prozess wird als „funktionelle Reifung“ bezeichnet (Sharpe et al., 2003). Entscheidende Faktoren für die Regulation der Differenzierung und Proliferation der Sertoli-Zelle sind FSH, Testosteron und Trijodthyronin ( $T_3$ ). Während FSH die mitotische Aktivität der Sertoli-Zelle erhöht (Griswold et al., 1977; Orth, 1982), führen Testosteron und  $T_3$  zu einer Proliferationshemmung (Buzzard et al., 2003). In dieser Phase der Entwicklung verliert die Sertoli-Zelle ihre Fähigkeit zur Proliferation. Die vorhandenen Zellen zeigen lediglich noch eine geringgradige Zunahme ihrer Zellgröße. In diesem Entwicklungsstadium wird die endgültige Zahl der Sertoli-Zellen im adulten Hoden festgelegt. Dies determiniert sowohl die Größe des Hodens als auch die Anzahl der Keimzellen, die von den Sertoli-Zellen in der Spermatogenese unterstützt werden können (Orth et al., 1988) und damit direkten Einfluss auf die Fertilität nehmen (Johnson et al., 1984).

Des Weiteren kommt es mit dem Proliferationsende der Sertoli-Zelle erstmals zur Ausbildung der komplexen Interzellularkontakte und damit zur Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke (Sharpe et al., 2003).

### 2.3.4.2 Funktion und Eigenschaften der adulten Sertoli-Zelle

Die Sertoli-Zelle hat vielfältige Funktionen für die Spermatogenese. Neben ihrer Funktion als „Ammen-“ und „Stützzelle“ bildet sie einen der wichtigsten Bestandteile der Blut-Hoden-Schranke, produziert das Androgen-bindende Protein, phagozytiert anfallende Keimzellreste und regelt die Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit. Auf diese Aufgaben wird im Folgenden genauer eingegangen.

#### 2.3.4.2.1 Stütz- und Ernährungsfunktion

Sertoli-Zellen bilden die Grundstruktur des Keimepithels und übernehmen hierbei eine rein mechanische Funktion für die Stabilität der Keimzellen in der Wand der Tubuli seminiferi (Liebich, 1999). Die Stützfunktion der einzelnen Sertoli-Zelle wird durch das gut ausgebildete Zytoskelett und die zahlreichen Zellkontakte zu anderen Zellen und nichtzellulären Elementen unterstützt. Ebenso dient der verzweigte

Zellkörper mit seiner großen Ausdehnung von basal bis adluminal als weiterer Faktor für die Stabilität.

Keimzellen besitzen mit Ausnahme der Spermatogonien weder Androgen- noch FSH-Rezeptoren und sind so durch den Kontakt zu den Sertoli-Zellen auf deren hormonelle Signalübermittlung angewiesen. Durch FSH und Testosteron werden die Sertoli-Zellen zur Produktion von für die Keimzellen essentiellen Faktoren angeregt (Aurich und Töpfer-Petersen, 2009). Zudem wird die Sertoli-Zelle zur Produktion intratubulärer Flüssigkeit angeregt, welche dem Spermientransport in den Nebenhoden und der Zufuhr von Nährstoffen dient (Sharpe, 2005). Durch die Bildung der Bluthodenschranke unterscheidet sich die Zusammensetzung der intratubulären Flüssigkeit von der Zusammensetzung des Blutplasmas. Daraus lässt sich schließen, dass die Sertoli-Zellen die Inhaltsstoffe für das speziell an die Keimzellentwicklung angepasste Mikromilieu selbst sezernieren (Kissinger et al., 1982).

### 2.3.4.2.2 Produktion von Androgen-bindendem Protein

Das Androgen-bindende Protein (ABP) wird auch als Sex-Hormon bindendes Globulin (SHBG) bezeichnet. Dieses bindet mit einer 4 – 5mal größeren Affinität im Vergleich zu Albumin, welches unspezifisch alle Klassen von Steroiden bindet, an Androgene und Östrogene. Die Steroid-Bindungs-Spezifität variiert zwischen den verschiedenen Spezies, wobei Androgene immer den bevorzugten Bindungspartner darstellen (Hammond, 2011). Das SHBG/ABP wird im Hoden von den Sertoli-Zellen sezerniert und ist ein extrazelluläres Transportprotein. Die primäre Funktion ist die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Androgenen. Hierfür gibt die Sertoli-Zelle das SHBG/ABP in das Tubuluslumen ab, von wo aus dieses in den Nebenhoden transportiert wird. Hier ist es maßgeblich daran beteiligt, die für die Spermienreifung notwendige hohe Konzentration von Androgenen zu gewährleisten. Ein geringerer Anteil, der von den basalen Sertoli-Zellen sezerniert wird, wird an das Blutsystem abgegeben. Die Sekretion wird von den Androgenen selbst und FSH geregelt. Da diese hormonellen Voraussetzungen sehr ähnlich zu denen für eine normale Spermatogenese sind, wird SHBG/ABP auch als biologischer Marker für die Sertoli-Zellfunktion verwendet (Petrusz, 2002).

### 2.3.4.2.3 Die Blut-Hoden-Schranke

Die Blut-Hoden-Schranke (Blood-Testis-Barrier, BTB), welche auch als Sertoli-Zellbarriere bezeichnet wird, stellt eine Barriere zwischen dem Kreislaufsystem und dem Inneren der Tubuli seminiferi dar. Durch Untersuchungen von Blutplasma, testikulärer Lymphe sowie Tubulusflüssigkeit konnte gezeigt werden, dass Proteine, Ionen und andere im Blutplasma und der Lymphe reichlich vorhandene Stoffe, in der Tubulusflüssigkeit nur in geringer Konzentration vorhanden sind (Setchell, 1967), was Rückschlüsse auf eine Passagebehinderung zwischen Kreislaufsystem und Tubulusinnerem zulässt. Die Barrierefunktion der BTB dient als immunologische Barriere, d.h., dass während der Spermiogenese gebildete Antigene vom Kreislaufsystem isoliert werden (Johnson, 1970b, a; Fijak und Meinhardt, 2006). Dies zeigt sich auch in Keimzelltransplantationsexperimenten, in welchen selbst spezieübergreifend eine vollständige Spermatogenese erreicht werden konnte (Schlatt et al., 1999). Die BTB dient aber auch als „Kontrollfilter“, welcher Nährstoffe, Ionen und Elektrolyte sowie parakrine, autokrine und hormonelle Faktoren, welche die BTB passieren und somit in das Tubulusinnere gelangen können, kontrolliert (Su et al., 2011). Damit schützt die BTB primäre Spermatozyten und haploide Spermatisiden vor potentiell schädlichen Substanzen durch eine Einschränkung der Passage von Molekülen aus dem Interstitium in das adluminale Kompartiment (Mruk und Cheng, 2004; Su et al., 2009). In verschiedenen Studien wurden Markersubstanzen in das Blutkreislaufsystem injiziert und es konnte beobachtet werden, dass bei der Verwendung großer Markersubstanzen, diese zwar die Kapillaren verlassen konnten und in das Interstitium eintraten, sich jedoch an der die Tubuli seminiferi umgebenden Myoidzellschicht ansammelten und nicht in den Tubulus eindringen konnten. Bei der Verwendung von Markersubstanzen mit einer kleineren molekularen Masse konnten diese bis in das Keimepithel eindringen und sammelten sich im Bereich der Spermato gonien und der präleptotänen Spermatozyten an (Dym und Fawcett, 1970; Vitale et al., 1973). Das weitere Eindringen wurde durch Zellverbindungen zwischen benachbarten Sertoli-Zellen verhindert. Diese Barriere des Keimepithels ist also die effektivste Komponente der BTB.

Die BTB entsteht durch den engen Kontakt benachbarter Sertoli-Zellen im basolateralen Bereich. Im Gegensatz zu anderen Blut-Gewebe-Schranken, wie der

Blut-Hirn- oder der Blut-Retina-Schranke, ist die BTB aus coexistierenden spezialisierten Zellkontakten zwischen benachbarten Sertoli-Zellen nahe der Basalmembran aufgebaut und nicht wie die meisten Blut-Gewebe-Schranken durch Zellkontakte der Endothelzellen der Blutgefäße (Mazaud-Guittot et al., 2010). Dies beinhaltet neben den in allen Blut-Gewebe-Schranken vorkommenden Tight-Junctions (TJ) ebenso Adherens-Junctions (AJ), Gap-Junctions (GJ) und basal ectoplasmic specializations (ES), bestehend aus einem spezialisierten Aktin-Filament Netzwerk (Wong und Cheng, 2005; Cheng und Mruk, 2009; Li et al., 2009; Cheng und Mruk, 2010). Durch diese Zellkontakte kommt es innerhalb des Tubulusepithels zur Kompartimentbildung. Grundsätzlich können zwei Kompartimente unterschieden werden: das basale Kompartiment, welches die Spermatogonien und Spermatozyten 1. Ordnung, die sich noch im preleptotänen Stadium befinden, enthält und das adluminale Kompartiment, in dem sich die Spermatozyten und Spermatischen, also die weiter differenzierten Keimzellen, befinden (Dym und Cavicchia, 1977; Yazama, 2008). Eine weitere Besonderheit der BTB gegenüber anderen Blut-Gewebe-Schranken ist die zyklische Umstrukturierung während der Spermatogenese, um die Migration der präleptotänen Spermatozyten in das adluminale Kompartiment zu ermöglichen (Mazaud-Guittot et al., 2010). Dym und Fawcett (1970) beschreiben die BTB als eine dynamische Struktur, die Phasen der Öffnung und Schließung durchläuft, was die Keimzellmigration erleichtert, jedoch nicht zu einem Integritätsverlust der BTB führen darf, um das Mikromilieu im Tubulusinneren aufrecht zu erhalten. Russel (1977) beschreibt ein drittes, intermediäres Kompartiment, welches zwischen den beiden permanenten Kompartimenten liegt. Dieser intermediäre Abschnitt der BTB bildet sich temporär während der Wanderung der Keimzellen aus dem basalen in das adluminale Kompartiment und beinhaltet eine schrittweise Bildung und gleichzeitigen Abbau von Tight-Junctions (Russell, 1977; Russell, 1978). Auf diese Weise kann die Integrität der BTB gewahrt bleiben. Im Gegensatz zu Tieren mit asaisonaler Fortpflanzung, bei denen dieser Aufbau über das gesamte Jahr hin konstant ist, zeigen sich bei saisonalen Tieren Veränderungen im Aufbau der BTB im Zusammenhang mit der Fortpflanzungsaktivität. So konnte Pelletier (1986, 1988) am Nerz zeigen, dass es beim Übergang aus der aktiven in die inaktive Spermatogenese Phase zum Verlust einer effektiven BTB kommt, die sich jedoch zyklisch zu Beginn jeder erneuten aktiven Fortpflanzungsphase des adulten Nerzes wieder aufbaut.

### 2.3.4.2.4 Phagozytosefunktion

Während der Spermatogenese kommt es bei mehr als der Hälfte der sich differenzierenden Keimzellen zur Apoptose (Wang et al., 2006a). Ebenso fallen in der Endphase der Spermiation Zytoplasmaresten, die Residualkörperchen, an. Diese apoptotischen Zellen und die zytoplasmatischen Rückstände werden von den Sertoli-Zellen phagozytiert (Russell und Clermont, 1977; Chemes, 1986).

Die Regulation der Phagozytose ist Teil der komplexen Interaktionen, die für die Regulierung der Keimzellentwicklung verantwortlich sind (Morales et al., 1986). Die für die Phagozytose zuständigen Zellorganellen sind die Lysosomen, welche zyklischen, d.h. stadienabhängigen Schwankungen unterliegen. So sind diese bei der Ratte im Stage I – IV des Keimepithelzyklus nur in geringer Zahl vorhanden, kommen in den Stage VI – VIII gehäuft vor und fallen nach der Spermiation wieder ab (Chemes, 1986). In weiteren Studien wurde eine Assoziation zwischen der Formation von Fetttröpfchen in Sertoli-Zellen und der Phagozytose von Residualkörperchen festgestellt, die ebenso in ihrer Anzahl zwischen den Stadien des Keimepithelzyklus variieren (Ueno und Mori, 1990; Wang et al., 2006a).

### 2.3.4.3 Differenzierungsmarker

Um verschiedene Zellen zu unterscheiden, können neben dem morphologischen Aussehen ebenso Differenzierungsmarker verwendet werden. Hierzu sind Proteine geeignet, die entweder nur in Zellen aus einer bestimmten Abstammungslinie exprimiert werden (mesoderm, ektoderm, entoderm) oder nur im Zusammenhang mit bestimmten Entwicklungsstadien der Zelle vorkommen.

Der immunhistochemische Nachweis dieser Proteine mittels spezifischen Antikörpern kann bei der Interpretation der unterschiedlichen Phänotypen helfen (Sharpe et al., 2003). Im Folgenden sollen charakteristische Sertoli-Zellmarker näher beschrieben werden.

#### 2.3.4.3.1 Vimentin

Vimentin ist ein Intermediär-Filament und hat einen Durchmesser von 6-11 nm, demnach liegt es mit seiner Größe zwischen den Mikrofilamenten (5-6 nm) und den



Mikrotubuli (20-25 nm) (Franke et al., 1978; Aumüller et al., 1992), woraus sich der Name Intermediär-Filament ableitet. Die drei genannten Strukturen bilden die Grundlage des Zytoskeletts (Aumüller et al., 1992).

Vimentin ist mesenchymalen Ursprungs und wird in allen Entwicklungsphasen, von der präpubertären bis hin zur terminal differenzierten adulten Sertoli-Zelle, exprimiert (Paranko et al., 1986; Aumüller et al., 1988; Aumüller et al., 1992; Rogatsch et al., 1996; Brehm und Steger, 2005), was den mesenchymalen Ursprung der Sertoli-Zelle belegt. Innerhalb des Tubulus seminiferus sind die Sertoli-Zellen die einzigen vimentin-exprimierenden Zellen (Aumüller et al., 1988) was eine eindeutige Identifikation ermöglicht. Im gesamten Hodengewebe konnte Vimentin auch in Leydig-Zellen, peritubulären Zellen, Fibrozyten, Lymphozyten und vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden (Franke et al., 1979). Die gewellten Fasern des Vimentins befinden sich in radialer Anordnung im Zytoplasma; ein verstärktes Auftreten zeigt sich in der Nähe des Nukleus (Franke et al., 1978; Katsumoto et al., 1990).

### 2.3.4.3.2 Anti-Müller-Hormon

Das Anti-Müller-Hormon (AMH), auch als Müllerian-Inhibiting-Substance (MIS) oder -Faktor (MIF) bezeichnet, ist ein Glykoprotein, das von den fetalen Sertoli-Zellen produziert wird. Das Hormon ist ein wichtiger Faktor in der männlichen Geschlechtsdifferenzierung. Es induziert die Rückbildung der Müller'schen Gänge und unterbindet somit die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsorgane (Josso et al., 1993; Loveland und Robertson, 2005; Kleine und Rossmann, 2009).

Während der postnatalen Entwicklungsperiode kommt es zu einem Rückgang der AMH-Produktion auf ein vernachlässigbares Niveau. Dieser Rückgang korreliert zeitlich mit dem Rückgang der Sertoli-Zellproliferation (Cooke et al., 2005). Demnach scheint AMH ein Sekretionsfaktor der Sertoli-Zelle zu sein, der eine wichtige Rolle als endokrines Hormon in der embryonalen Entwicklung übernimmt (Skinner, 2005).

Die AMH-Expression der Sertoli-Zellen wird durch drei Faktoren reguliert (Josso et al., 2001). Die wichtigsten Regulatoren sind die Androgene. Rey et. al. (1994) zeigten in ihrer Studie bei Kindern mit Androgen-Unempfindlichkeit, dass AMH nicht nur in der Pubertät negativ mit Testosteron korreliert, sondern auch in der postnatalen Entwicklungsphase. Da der AR in der fetalen und pränatalen

Entwicklung nicht exprimiert wird (Hill et al., 2004), hat Testosteron zu diesem Zeitpunkt keine Möglichkeit an die Sertoli-Zellen zu binden und kann aufgrund dessen AMH in diesem Stadium der Entwicklung nicht hemmen (Al-Attar et al., 1997). Dies erklärt die zeitlich begrenzte Expression von AMH.

In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Testosteron und Gonadotropine einen gegensätzlichen Effekt auf die AMH-Produktion ausüben. Da die negative Wirkung des Testosteron potenter ist als die stimulierende Wirkung der Gonadotropine, zeigt sich diese nur in Abwesenheit von Androgenen (Al-Attar et al., 1997; Josso et al., 2001). Der dritte Faktor der AMH Expression ist die Reifung der Keimzellen. Sertoli-Zellen in Tubuli, die Keimzellen enthalten, welche bereits in die Meiose eingetreten sind, zeigen einen früheren Rückgang der AMH-Expression als solche, denen meiotische Keimzellen fehlen. Es zeigt sich ein synergistischer Effekt von Testosteron und meiotischen Keimzellen (Al-Attar et al., 1997).

AMH kann demnach als Marker für die Funktion der präpubertären Sertoli-Zellen genutzt werden (Josso et al., 1990; Yamanaka et al., 1991; Josso, 1995; Lee et al., 1996).

### 2.3.4.3.3 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Steroidhormonrezeptor, der Testosteron und Dihydrotestosteron bindet und zur Gruppe der nukleären Rezeptoren zählt.

Die nukleäre Expression des AR ist ein Merkmal der reifen Sertoli-Zelle (Sharpe et al., 2003), dessen funktionelle Aktivität in Abhängigkeit vom Stadium des Keimepithels variiert und das Maximum im Stadium VII und VIII bei Ratten (Bremner et al., 1994; Shan et al., 1997; Hill et al., 2004) und im Stadium IV bis VI beim Menschen erreicht (Suarez-Quian et al., 1999). Diese stadienspezifische Expression des ARs wird als ein wichtiger Mechanismus für die Regulation der Reaktionsfähigkeit der Sertoli-Zelle auf Testosteron und für die anschließende Kontrolle der Spermatogenese angesehen (Regadera et al., 2001). Im Gegensatz dazu wird der AR in der fetalen und frühen pränatalen Periode der Entwicklung nicht exprimiert (Hill et al., 2004).

### 2.4 Zell-zu-Zell-Verbindungen

Zellmembranen benachbarter Zellen gehen untereinander Verbindungen ein, diese interzellulären Verbindungen sind strukturell und biochemisch differenzierte Bereiche der Plasmamembran. In den Säugerzellen lassen sich die Zell-zu-Zell Verbindungen in vier Kategorien einteilen: Adherens-Junctions (AJ), Desmosomen (DS), Tight-Junctions (TJ) und Gap-Junctions (GJ) (Abb.2) (Farquhar und Palade, 1963; Stevenson und Paul, 1989; Furuse et al., 1993). Alle gemeinsam werden als Verbindungskomplex (junctional complex) der Zelle bezeichnet.

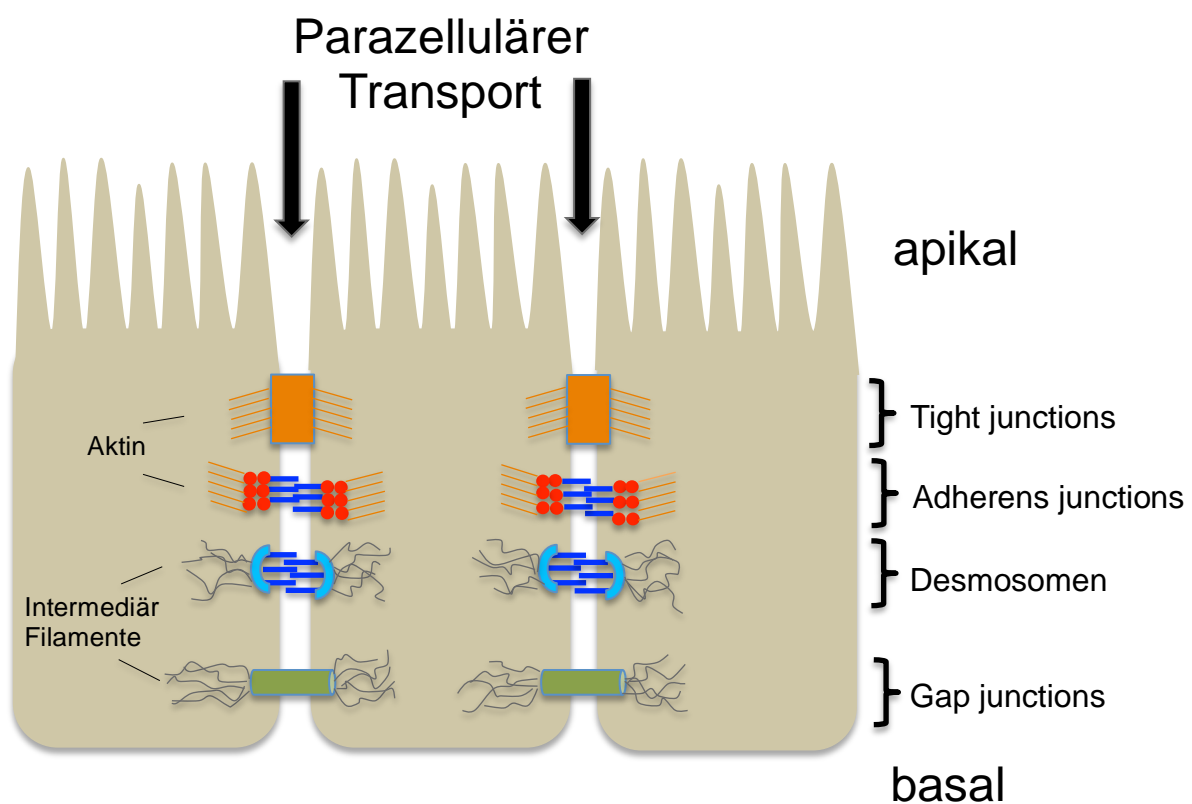


Abb. 2 Zell-Zell Verbindungen in Epithel- und Endothelzellen; schematische Darstellung einer Epithelzelle, in der die vier Zell-Zell-Verbindungen in der Plasmamembran dargestellt sind.

Es ist bekannt, dass innerhalb der verschiedenen Zellverbindungen jeweils spezifische Integralmembranproteine konzentriert sind. So stellt das Hauptprotein der AJ das Cadherin dar (Takeichi, 1991). In der Gruppe der DS werden die Membranproteine als Desmoglein und Desmocollin bezeichnet (Buxton et al., 1993).

Untersuchungen haben gezeigt, dass letztgenannte Proteine in ihrer Aminosäuresequenz große Ähnlichkeiten zu den Cadherinen aufweisen und somit ebenfalls in die Cadherin-Superfamilie eingeordnet werden können (Holton et al., 1990; Koch et al., 1990). Weiterhin zeigen diese beiden Gruppen Gemeinsamkeiten in ihrer Funktion, weshalb sie unter der Bezeichnung Zonula Adhaerens oder Macula Adhaerens zusammengefasst werden. Beide Gruppen stellen feste Verankerungen der Zellen untereinander dar, um den Zellkomplex vor entstehenden Scherkräften zu schützen. Der Unterschied zwischen beiden besteht darin, dass AJ die Zellen über Aktinfilamente miteinander verbinden, im Gegensatz dazu besteht die Verbindung bei den DS über Intermediärfilamente.

Die dritte Gruppe bezeichnet die TJ, deren Hauptkomponenten die Occludine und Claudine sind. Diese undurchlässigen Zellkontakte bilden eine selektive Permeabilitätsbarriere und gewährleisten somit die Regulation der Passage von Ionen, Wasser und Molekülen während des parazellulären Transports (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Die letzte Gruppe der Zellverbindungen stellen die kommunizierenden Zellkontakte dar. Diese als GJ bezeichneten, röhrenförmigen Verbindungen benachbarter Zellen setzen sich aus zwei Kanalstrukturen, Connexone, zusammen, die wiederum jeweils aus 6 der für diese Zellkontakte charakteristischen Connexine aufgebaut sind (Yeager und Nicholson, 1996; Saez et al., 2005). Im Gegensatz zu allen anderen Gruppen der Zellkontakte ermöglichen die kanalförmigen GJ einen direkten Stoffaustausch von Zelle zu Zelle und stellen einen wichtigen Bestandteil der elektrischen Kopplung bestimmter Zellen im Organismus dar.

### 2.4.1 Tight-Junctions

#### 2.4.1.1 Morphologie und Funktion

TJ sind spezifische Zellverbindungen eines Verbindungskomplexes, welche die Integrität epithelialer Zellschichten, die multizelluläre Organismen vor der äußeren Umgebung schützen, ermöglichen. TJ bilden eine dichte, gürtelähnliche Struktur im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran der Zelle (Chalcroft und Bullivant, 1970). Elektronenmikroskopisch erscheinen TJ als eine Reihe von Verschmelzungen der äußeren Schicht der Plasmamembran benachbarter Zellen, wodurch es zur

Obliteration des interzellulären Raumes an dieser Stelle kommt, was als „kissing points“ bezeichnet wird (Farquhar und Palade, 1963; Kubota et al., 1999; Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Innerhalb der Lipid-Doppelschicht jeder Membran formen die als TJ-Stränge bezeichneten, linear zusammengelagerten integralen Membranproteine ein Netzwerk und führen so zur Verengung des Interzellularraums (Furuse et al., 1999). Durch die enge Verbindung benachbarter Zellen kommt es zur Ausbildung einer Barriere für den parazellulären Transport von Wasser, Ionen und gelösten Stoffen. Diese Eigenschaft der TJ wird als „Gate“ oder Barriere-Funktion bezeichnet (Diamond, 1977; Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Hartsock und Nelson, 2008). Die so entstehende selektive Permeabilität für verschiedene Stoffe kann durch zwei verschiedene Faktoren beeinflusst werden: die hydrophilen Poren, die zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand variieren können (Claude, 1978) und die in Abhängigkeit vom TJ-exprimierenden Zelltyp variierende Permeabilität und Ionen-Selektivität (Powell, 1981).

Neben der Barriere-Funktion haben die TJ eine weitere Aufgabe. Sie unterteilen die Membran der Zelle in einen apikalen und einen basolateralen Abschnitt, woraus sich die Bezeichnung „fence“ (Zaun-) Funktion ableitet (Schneeberger und Lynch, 1992; Hartsock und Nelson, 2008; Schulzke und Fromm, 2009). Der Unterschied dieser beiden Kompartimente liegt in der Zusammensetzung der integralen Membranproteine und Lipide. Durch die Anordnung der TJ innerhalb der Membran wird die normalerweise freie Diffusion der Membranproteine innerhalb der Lipiddoppelschicht verhindert (Tsukita et al., 2001) und ein gerichteter Transport von Stoffen über die Epithel- bzw. Endothelschichten ermöglicht. Durch diese Trennung in zwei Kompartimente können auf beiden Seiten des Epithels unterschiedliche Konzentrationen an Nährstoffen und Ionen erzeugt und aufrechterhalten werden. Dies wiederum führt zur Entstehung und Erhaltung einer Epithel- und Endothelzell-Polarität (Rodriguez-Boulau und Nelson, 1989).

Die TJ kommen an verschiedenen Stellen im Organismus, wie in der Blut-Hirn-Schranke sowie in der Blut-Retina-Schranke vor (Harhaj und Antonetti, 2004) und sorgen hier für die Aufrechterhaltung der Homöostase und für den Schutz der Gewebe vor schädlichen Substanzen. Ebenso sorgen sie in der Niere für die selektive Durchlässigkeit der Nierentubuli und verhindern somit die Vermischung des

Ultrafiltrates mit dem Blut. In den Darmmukosazellen verhindern die TJ das Eindringen pathogener Keime (Berkes et al., 2003).

Um die Integrität der TJ zu beurteilen, stehen zwei Methoden zur Verfügung: die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) und der parazelluläre Fluss von Markersubstanzen (Harhaj und Antonetti, 2004). Der TER setzt sich zusammen aus der Summe des parazellulären Widerstandes, bestehend aus dem Widerstand der Zellverbindungen selbst und dem des interzellulären Raumes sowie dem transzellulären Widerstand, welcher wiederum aus dem Widerstand der apikalen sowie der basolateralen Zellmembran besteht (Claude und Goodenough, 1973; Claude, 1978).

### 2.4.1.2 Molekularer Aufbau

Der molekulare Aufbau der TJ ist bis heute noch nicht bis ins Detail entschlüsselt; es ist allerdings bekannt, dass die TJ einen Multiproteinkomplex darstellen. Die beteiligten Proteine lassen sich in zwei Klassen einteilen: die Transmembranproteine und die membranassoziierten bzw. Tight-Junction-assoziierten Proteine, zu welchen Adapterproteine, regulatorische Proteine und transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulatoren zählen (Matter und Balda, 2003). Das Grundgerüst und den Hauptbestandteil bilden die Transmembranproteine, Occludin und die Proteine der Claudinfamilie. Diese durchspannen mit ihren jeweils vier transmembranären Domänen die Membran der Zellen und stellen durch ihre Interaktionen mit komplementären Proteinen benachbarter Zellen die eigentlichen Zell-Zell-Verbindungen her. Ein weiteres Transmembranprotein ist das Junctional Adhaesions Molecule (JAM), welches räumlich gesehen vom Lumen ausgehend unterhalb der Occludine und Claudine ausgebildet wird. Der Unterschied zu den anderen beiden Proteinen besteht darin, dass dieses nur eine membrandurchspannende Domäne besitzt.

Auf der zytoplasmatischen Seite bilden die TJ sogenannte Plaques aus einer Vielzahl TJ-assoziiierter Proteine. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem die Zonula Occludens Proteine (ZO). Diese nicht-integralen Membranproteine konnten elektronenmikroskopisch sowie durch Immunfluoreszenz in unmittelbarer Nachbarschaft zu den TJ lokalisiert werden (Stevenson et al., 1986; Stevenson und

Keon, 1998). Sie stellen die intrazytoplasmatische Verbindung zwischen den transmembranären Proteinen Occludin und Claudin und den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts her und gewährleisten so die strukturelle Verankerung der TJ (Gonzalez-Mariscal et al., 2000). Die ZO gehören zur Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) und werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit ZO-1, ZO-2 und ZO-3 benannt.

### 2.4.1.3 Tight-Junctions im Hoden

Im Hoden bilden die TJ zwischen den Sertoli-Zellen die BTB (Russell und Peterson, 1985). Der Verbindungskomplex „junctional complex“ in den verschiedenen Epithelien ist bezogen auf die Reihenfolge, in welcher die verschiedenen Zellverbindungen angeordnet sind immer gleich, wobei die TJ die apikalste Position einnehmen und damit die erste Hürde für die Diffusion von Stoffen aus dem Lumen in das Gewebe bilden. Im Gegensatz dazu konnten im Hoden die am Aufbau der BTB beteiligten TJ in direkter Nachbarschaft zur Basalmembran des Keimepithels nachgewiesen werden (Gilula et al., 1976; Cheng und Mruk, 2002; Wong et al., 2008). Hier übernehmen die TJs also die erste Hürdenfunktion für aus dem Blut und Interstitium eindringende Stoffe, was die wichtige Rolle der TJ in Bezug auf die Barrierefunktion der BTB erklärt.

Einen weiteren Unterschied stellt der Zeitpunkt der Expression dar. So können in den meisten Geweben und Epithelien die TJ schon vor bzw. spätestens zum Zeitpunkt der Geburt nachgewiesen werden. Im Hodengewebe ist in der präpubertären Phase noch kein bzw. nur ein Nachweis blind endender, diffus in der lateralen Membran der Sertoli-Zellen verteilter TJ möglich (Moroi et al., 1998). Erst mit dem Beginn der Pubertät und dem damit verbundenen Anstieg des Testosterons und dem Beginn der Spermatogenese kommt es zur Expression bzw. zur geordneten Lokalisation im basalen Bereich der Sertoli-Zelle (Kormano, 1967; Vitale et al., 1973). Dieser Expressionszeitpunkt erklärt sich über die Tatsache, dass mit dem Beginn der Entwicklung der Keimzellen diese vor dem eigenen Immunsystem geschützt werden müssen. Die BTB separiert die Antigene auf der Zelloberfläche der Keimzellen von der systemischen Zirkulation und verhindert somit den Übertritt von im Blut zirkulierenden Immunglobulinen und Lymphozyten in das Keimepithel (Setchell et al., 1969; Dym und Fawcett, 1970).

Im Gegensatz zu TJ anderer Gewebe sind die TJ in der BTB bei der Wanderung der präleptotänen Spermatozyten aus dem basalen in das adluminale Kompartiment partiell durchlässig wobei die Integrität der beiden Kompartimente des Keimepithels gewahrt bleibt. Für den Auf- und Abbau der TJ sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben: 1.) Das „Reißverschluss-System“ (Dym und Fawcett, 1970), bei welchem während der Migration der präleptotänen Spermatozyten in das adluminale Kompartiment ein zeitgleicher Abbau der Zellverbindungen apikal mit einem Aufbau basal der Spermatozyten stattfindet (Pelletier und Byers, 1992). 2.) Die Bildung eines dritten temporären, intermediären Kompartiments, das sich während der Keimzellmigration (Russell, 1977) zwischen dem basalen und dem adluminalen Kompartiment ausbildet und die präleptotänen Spermatozyten einschließt (Russell, 1978).

### 2.4.1.3.1 Occludin

Occludin (OCLN) ist ein integrales Membranprotein mit einer molekularen Masse von ca. 65 kDa, welches erstmals von Furuse et al. (1993) im Huhn beschrieben wurde. OCLN ist ein TJ-Protein, welches ausschließlich in den TJ-Strängen von epithelialen und endothelialen Zellen lokalisiert ist (Furuse et al., 1993). Erst 1996 veröffentlichten Ando-Akatsuka et al. die DNA-Sequenzen der Säugetier OCLN-Gene von Maus, Rattenkänguruh, Hund und Mensch, was die Durchführung von gezielten Genmodifikationen ermöglichte und damit die Voraussetzung für die weitere Erforschung der OCLN schaffte (Ando-Akatsuka et al., 1996).

Im molekularen Aufbau von OCLN zeigen sich 4 transmembranäre Domänen (M1-M4) des N-Terminus, welche das Protein in 5 separate Domänen unterteilt (Furuse et al., 1993; Feldman et al., 2005). Diese Aufteilung in 5 Abschnitte bestehend aus einem N-terminalen Ende, 2 extrazellulären Schleifen, 1 intrazellulären Schleifen und dem cytoplasmatischen C-terminalen Ende, beim OCLN bestehend aus 255 Aminosäuren (Furuse et al., 1994), zeigt sich ebenso bei anderen integralen Membranproteinen, wie zum Beispiel den Connexinen der GJ. Zwar zeigen diese beiden Proteine keine Sequenzhomologie zueinander, dennoch lässt sich eine Ähnlichkeit zwischen der Barriere-Funktion der OCLN und der interzellulären Kanalfunktion der Connexine erkennen. Während die OCLN durch ihre lineare Anordnung den elektrischen Widerstand zwischen apikalem und basolateralem



Extrazellulärspalt aufrechterhalten, ermöglicht die zirkuläre Anordnung der Connexine die Entstehung eines elektrischen Widerstandes zwischen dem Inneren des Kanals und dem Extrazellulärraum (Loewenstein, 1987; Furuse et al., 1993). Auffällig bei der Betrachtung der beiden extrazellulären Schleifen der OCLN-Proteine ist der für die OCLN charakteristische, ungewöhnlich hohe Anteil an Tyrosin- und Glycin-Resten sowie die Lokalisation der geladenen Reste in den zytoplasmatischen Domänen (Furuse et al., 1993).

Saitou et al. (2000) zeigten in Untersuchungen an OCLN-knockout-Mäusen, dass männliche, jedoch nicht weibliche Tiere infertil waren; die weiblichen Mäuse wiesen lediglich ein vermindertes Säugetverhalten gegenüber ihren Jungtiere auf. Interessanterweise zeigten die -/- Mäuse außer einer testikulären Atrophie keine makroskopisch-morphologischen Veränderungen sowie eine auf elektrophysiologischer Ebene normale Barriere-Funktion des intestinalen Epithels. Erst auf histologischer Ebene konnten Veränderungen in verschiedenen Geweben, festgestellt werden.

Die Tatsache, dass TJ in Abwesenheit von OCLN normal gebildet werden können sowie in ihrer Funktionalität normal erscheinen (Saitou et al., 1998; Saitou et al., 2000) lässt darauf schließen, dass die Aufgabe der OCLN in der Regulation des parazellulären Transports liegt und sie keine strukturelle oder funktionelle Komponente der TJ darstellen (Bamforth et al., 1999). Auch Balda et al. (2000) beschreiben, dass die Expression von genetisch verändertem OCLN einen starken negativen Effekt auf die selektive, parazelluläre Diffusion ausübt und hier insbesondere die beiden extrazellulären Schleifen sowie eine der transmembranären Domänen involviert sind.

### 2.4.1.3.2 Occludin im Hoden

In der frühen prapupertären Phase der Entwicklung des Hodens befinden sich OCLN-Proteine diffus verteilt auf der lateralen Membran der Sertoli-Zellen und erst im Verlaufe der Entwicklung konzentrieren sich die OCLN im basalem Bereich der Sertoli-Zelle (Moroi et al., 1998). Diese Entwicklung steht im zeitlichen Zusammenhang mit der Ausbildung der BTB. Chung et al. (2001) zeigten in ihrer Studie die Bedeutsamkeit von OCLN für die Integrität der BTB. Dabei stellten sie fest, dass es am 27. Tag nach der Injektion eines synthetischen Peptids in das

Hodengewebe von Ratten, welches die OCLN-OCLN Interaktionen stört, zu einem reversiblen Verlust von Spermatozyten und Spermatiden in allen Tubuli kam. Dieser Zeitraum, in welchem eine gestörte Spermatogenese bei den behandelten Ratten vorlag, stimmte genau mit dem Zeitraum überein, in welchem es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BTB für Markersubstanzen kam (Chung et al., 2001). Auch Gye (2004) konnte in seiner Studie an caninem Hodengewebe eine starke Immunreaktivität im basalen Bereich der Sertoli-Zellen nachweisen. Weiterhin konnte dieser ein diffuses Signal im Zytoplasma der Sertoli-Zellen detektieren, was aufgrund der zeitgleichen Expression des TJ-assoziierten ZO-1 Proteins als spezifisch angesehen werden kann (Gye, 2004). Dieser Nachweis von OCLN im Zytoplasma und im TJ-Bereich der Sertoli-Zelle beim Hund stimmt mit der Maus und Ratte überein (Moroi et al., 1998; Cyr et al., 1999), weshalb OCLN in den Sertoli-Zellen möglicherweise als Pool für TJs dient (Gye, 2004). Wie schon von Cyr et al. (1999) bei der Maus beschrieben, zeigt sich auch beim Hund keine stadienspezifische Expression des Proteins (Gye, 2004). Im Gegensatz dazu weisen Untersuchungen an der Ratte sowie am Dsungarischen Hamster auf eine stadienspezifische Expression hin (Li et al., 2006; Tarulli et al., 2008). Bei Meerschweinchen und Mann konnte interessanterweise keine Expression von Occludin in den Tubuli seminiferi nachgewiesen werden (Moroi et al., 1998). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Bedeutung von Occludin in der Regulation der Integrität der BTB spezies-spezifisch zu sein scheint.

### 2.4.1.3.3 Claudin

Furuse et al. (1998) entdeckten zwei weitere Bestandteile des TJ-Komplexes, die als Claudin-1 und -2 (CLDN-1; CLDN-2) beschrieben wurden. CLDN gelten seitdem als wichtigste Barriere-bildende Proteine der TJ. Sie sind wie die OCLN integrale Membranproteine, die aus einem N-terminalen Ende, zwei extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife, vier transmembranären Domänen und einem C-terminalen Ende aufgebaut sind. Dennoch weisen die beiden Proteine keine Sequenzhomologie zueinander auf (Furuse et al., 1998). Charakteristisch für die CLDN sind 2 unterschiedlich lange, extrazelluläre Schleifen, die eine Reihe von konservierten und geladenen Aminosäureresten aufweisen. Weiterhin besitzt der kurze intrazelluläre C-Terminus eine hochkonservierte Aminosäuresequenz (PDZ-

Domäne), welche als Bindeglied zu zytoplasmatischen Proteinen mit PDZ-Region dient und somit für die Verbindung der TJ zum Zytoplasma von Bedeutung ist (Itoh et al., 1999; Hamazaki et al., 2002). Mit 20 – 27 kDa besitzen die CLDN eine deutlich geringere molekulare Masse als die OCLN (Van Itallie und Anderson, 2006). CLDN sind eine multigene Proteinfamilie, welche bei den Säugetieren aus 24 Mitgliedern besteht (Van Itallie und Anderson, 2004), wobei jedes der einzelnen CLDN-Proteine in verschiedenen Geweben in Abhängigkeit von der exprimierten CLDN-Art ein einzigartiges Expressionsmuster aufweist. In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass viele Gewebe mehrere Mitglieder der CLDN-Familie gleichzeitig exprimieren können (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999a; Rahner et al., 2001). Bei der Zusammenlagerung der einzelnen CLDN werden zwei Formen unterschieden: die Seit-zu-Seit-Verbindung innerhalb einer Membran zur Ausbildung der TJ-Stränge und die Kopf-an-Kopf-Verbindungen zu den CLDN der TJ-Stränge benachbarter Zellen. Ähnlich wie bei den Connexonen der GJ, welche durch ihren Aufbau aus entweder 6 gleichen oder der Kombinationen unterschiedlicher Mitglieder der Connexin-Familie bestehen, können auch die TJ-Stränge aufgrund der Tatsache, dass in vielen Geweben verschiedenen CLDN-Proteine exprimiert werden, in homo- und heterophile Verbindungen unterteilt werden. Während eine homophile Verbindung zwischen 2 identisch aufgebauten, benachbarten TJ-Strängen besteht, setzt sich eine heterophile Verbindung aus 2 unterschiedlich aufgebauten TJ-Strängen zusammen. Weitere Kombinationsmöglichkeiten ergeben sich durch unterschiedlichen Claudin-Paarungen innerhalb der einzelnen TJ-Stränge, dabei beschreibt ein homomerer/homopolymerer Aufbau einen TJ-Strang, der aus nur einem Mitglied der Claudin-Familie aufgebaut ist, während eine heteromere/heteropolymere Verbindung einen TJ-Strang beschreibt der sich aus unterschiedlichen Claudinen zusammensetzt. Daraus ergibt sich die Möglichkeit von vier Modellen der Paarung einzelner TJ-Stränge (Abb.3) (Furuse et al., 1999), wobei eine Co-Polymerisation nicht zwischen jeden beliebigen CLDN-Proteinen stattfinden kann. So konnte in Untersuchungen zwar eine Bindungsfähigkeit von Claudin-3 sowohl mit Claudin-1 und Claudin-2 festgestellt werden, nicht aber von Claudin-1 und Claudin-2 (Furuse et al., 1999).

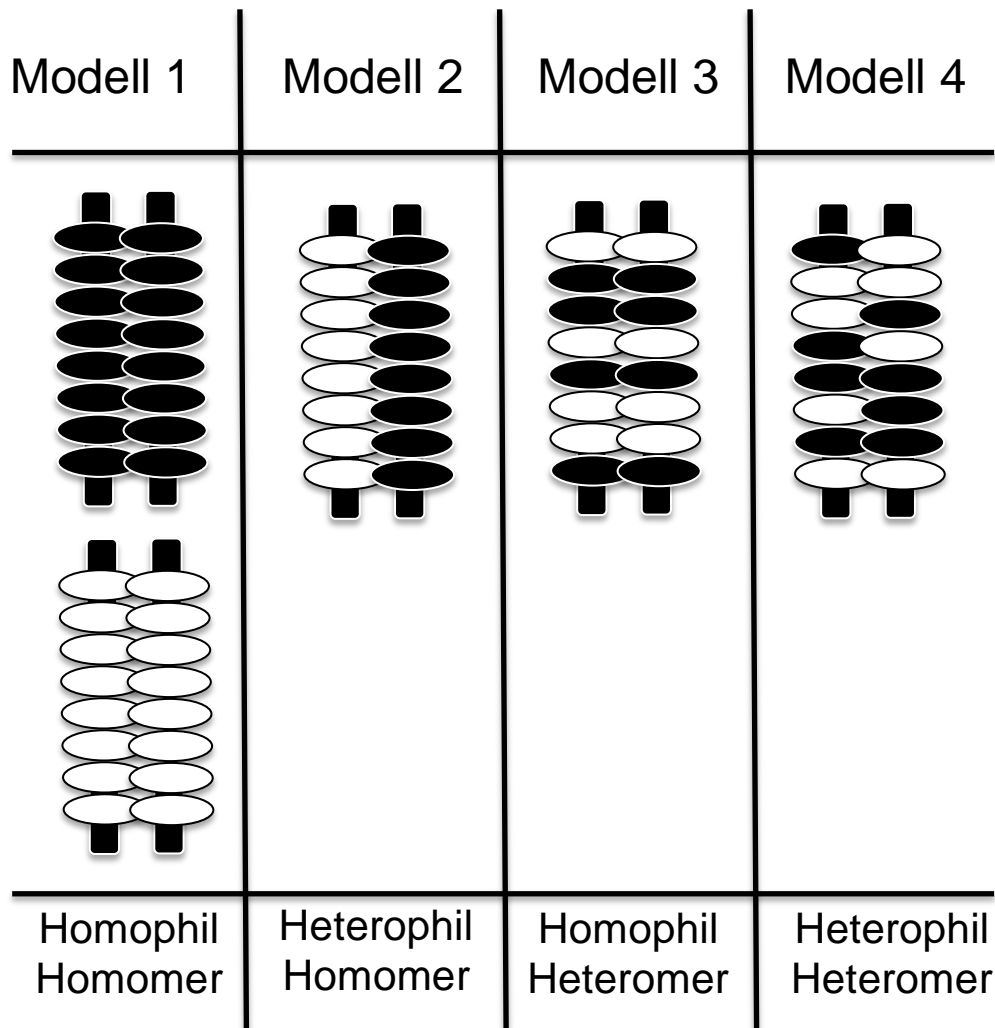


Abb. 3 Modelle der Paarung einzelner Tight-Junction-Stränge:

Modell 1: Zusammenlagerung zweier TJ-Stränge benachbarter Zellen bestehend aus nur einer Claudin-Art; Modell 2: Zusammenlagerung zweier TJ-Stränge benachbarter Zellen aus 2 Claudin-Arten, wobei jeder TJ-Strang nur aus einem Mitglied der Claudin-Familie aufgebaut ist; Modell 3: Zusammenlagerung zweier TJ-Stränge benachbarter Zellen, bestehend aus verschiedenen Claudinen, wobei beide TJ-Stränge identisch aufgebaut sind; Modell 4: Zusammenlagerung zweier TJ-Stränge benachbarter Zellen, wobei die beiden Stränge aus unterschiedlichen Claudinen zusammengesetzt sind. Modifiziert nach Furuse et al. (1999).

Die Intensität der Interaktionen zwischen den CLDN und damit die Dichtigkeit der TJ ist abhängig von den jeweilig beteiligten CLDN und deren Kombination untereinander

(Furuse et al., 1999). So konnten schon Stevenson et al. (1988) vor der Entdeckung der CLDN zeigen, dass Madin-Darby canine kidney Zellen (MDCK) I und II zwar einen signifikanten Unterschied in der Ausbildung des transepithelialen Widerstandes aufwiesen, aber kein Unterschied in der Anzahl der ausgebildeten TJ-Stränge zwischen den beiden Zellklonen nachweisbar war, was auf einen qualitativen Unterschied der gepaarten TJ-Stränge schließen ließ. Dieser qualitative Unterschied lässt sich unter anderem durch die Ausbildung von hydrophilen Poren erklären. Die unterschiedlichen Durchmesser der Poren, welche durch die Beteiligung unterschiedlicher CLDN zu Stande kommen, führen zu einer Größenselektion der die Barriere passierenden Moleküle. Weiterhin kommt es durch den unterschiedlichen Aufbau der verschiedenen CLDN zu einer Ladungs-Selektivität. Diese entsteht, wenn bestimmte Stellen der Pore durch saure Aminosäurereste in der extrazellulären Schleife negativ geladen sind und somit die Passage für Kationen im Vergleich zu Anionen erleichtert wird (Furuse und Tsukita, 2006).

### 2.4.1.3.3.1 Claudin-3

CLDN-3 ist ein Mitglied der Claudinfamilie, dessen Größe mit 22 bis 23 kDa angegeben wird. Da das Expressionsmuster der einzelnen CLDN in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe, in dem es exprimiert wird, variiert, lässt sich auch die mRNA von CLDN-3 in unterschiedlichen Mengen nachweisen. In Lunge und Leber wird es in großen Mengen exprimiert, lässt sich aber nur in geringem Umfang in Niere und Hoden nachweisen. Im Hoden wird die Regulation der Expression von CLDN-3 über den AR in den Sertoli-Zellen kontrolliert. So zeigt sich bei der Sertoli-zellspezifischen Ablation des ARs eine signifikante Verringerung der CLDN-3 mRNA. Diese verringerte Expression führt zu einer erhöhten Permeabilität der BTB für Moleküle mit einer molekularen Masse <600 Da (Meng et al., 2005). Untersuchungen an Mäusehoden zeigen einen ersten Nachweis von CLDN-3 mRNA an Tag 15 postnatal mit einem Anstieg bis zum Tag 20 und einem darauffolgenden Abfall auf Werte vergleichbar mit den Werten von Tag 15. Gleiche Ergebnisse zeigen sich auf Proteinebene bei Westernblot-Untersuchungen mit zeitlich leicht versetztem Verlauf (Meng et al., 2005). Auch in immunhistochemischen Untersuchungen konnte ein erstes Signal am Tag 15 detektiert werden. Am Tag 20 zeigte sich eine Lokalisation des Signals im Bereich der BTB. Im weiteren Verlauf konnte bei adulten Mäusen, wie

auch bei CLDN-5, eine stadienspezifische Expression nachgewiesen werden, die in Stadien beobachtet werden konnte, in welchen die präleptotänen und leptotänen Spermatozyten die BTB passieren (Meng et al., 2005). Bei genauer Betrachtung des Expressionsmusters in der Immunhistochemie zeigt sich ein typisches Bild für die Theorie von Russel (1977), in welcher ein intermediäres Kompartiment der BTB beschrieben wird. So kann man in Stage VIII und frühem Stage IX ein Signal sowohl apikal, als auch basal der präleptotänen und leptotänen Spermatozyten nachweisen (Komljenovic et al., 2009; Morrow et al., 2010), wodurch Claudin-3 als ein Marker für das von Russell (1977) beschriebene intermediäre Kompartiment angesehen werden kann.

### 2.4.1.3.3.2 Claudin-5

Claudin-5 (CLDN-5), was auch als TMVCF (transmembrane protein deleted in velo-cardio-facial factor) bezeichnet wird, hat eine Größe zwischen 22 und 24 kDa und wurde bereits in vielen verschiedenen Geweben wie Leber, Pankreas, Darm, Gehirn, Skelettmuskel und Herz nachgewiesen (Morita et al., 1999a; Rahner et al., 2001; Nitta et al., 2003; Sanford et al., 2005). Auffällig bei diesem Mitglied der CLDN-Familie ist die für TJ normalerweise charakteristische, in diesem Fall aber fehlende Expression in Epithelzellen. Umso stärker hingegen ist die Ausprägung in den Endothelzellen von Blutgefäßen, was auf eine zentrale Rolle von CLDN-5 in der Regulation der Gefäßpermeabilität hindeutet (Morita et al., 1999c). Bei einer Mutation von CLDN-5 kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für Moleküle mit einer molekularen Masse <800 Da (Nitta et al., 2003). Im Hoden konnte bei Mäusen eine Erhöhung der mRNA Expression des CLDN-5 Proteins zum Zeitpunkt der Ausbildung der TJ zwischen benachbarten Sertoli-Zellen und der damit verbundenen Entstehung der BTB nachgewiesen werden (Morrow et al., 2009; Morrow et al., 2010). Auf Proteinebene gelang der Nachweis einer stadienspezifischen Expression in Sertoli-Zellen, Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten (Morrow et al., 2009).

### 2.4.1.3.3.3 Claudin -11

Claudin-11 (CLDN-11) ist ein Protein mit einer molekularen Masse von 21 kDa und wird auch als Oligodentocyte-specific Protein (OSP) bezeichnet (Hellani et al., 2000). Es zeigt eine spezifische Expression im Gehirn und im Hoden und bildet hier TJ-Stränge zwischen benachbarten Oligodentozyten bzw. Sertoli-Zellen und trägt damit zur Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke sowie der BTB bei (Morita et al., 1999b). Die Expression von CLDN-11 im Hoden beginnt bereits fetal unmittelbar nach dem Peak von SRY und vor dem Peak von AMH und setzt sich mit einem veränderten Expressionsmuster postnatal fort (Hellani et al., 2000). So zeigen Untersuchungen am Hodengewebe der Maus postnatal am Tag 13 ein Signal im gesamten Keimepithel der Tubuli seminiferi, welches sich ab Tag 20 auf die Region der BTB konzentriert (Morita et al., 1999b; Hellani et al., 2000; Mazaud-Guittot et al., 2010). Eine Studie an CLDN-11 knockout Mäusen zeigte, dass die Mäuse sowohl neurologische als auch reproduktive Defizite aufwiesen. Neurologisch führte der knockout zu verlangsamten Nervenleitgeschwindigkeiten und Hinterhandlahmheiten. Bei männlichen Tieren konnte eine Verkleinerung der Hoden um 30 – 50% im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sowie eine Unfruchtbarkeit beobachtet werden (Gow et al., 1999). Im Gegensatz zu den beiden anderen Mitgliedern der CLDN-Familie, CLDN-3 und CLDN-5, kann die Expression von CLDN-11 in allen Stadien der Spermatogenese nachgewiesen werden (Hellani et al., 2000; Meng et al., 2005; Mazaud-Guittot et al., 2010). Regulierende Faktoren für die CLDN-11 Expression im Hoden sind FSH, Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) sowie Testosteron. FSH und TNF $\alpha$  führen zu einer Hemmung der Expression von CLDN-11 (Hellani et al., 2000), Testosteron hingegen zu einer Erhöhung der Expression (Kaitu'u-Lino et al., 2007). Letzteres konnte an Sertoli-zellspezifischen AR-knockout Mäusen bestätigt werden, da es hier zu einem signifikanten Abfall der CLDN-11 Expression kam (Tan et al., 2005; Wang et al., 2006b).

### 2.4.2 Gap-Junctions

#### 2.4.2.1 Aufbau und Funktion

Nexus oder Gap-Junctions (GJ) sind spezialisierte Regionen der Plasmamembran, in welchen Protein-Oligomere mit benachbarten Zellen in Kontakt stehen. GJ ermöglichen über die Bildung von Kanalproteinkomplexen die interzelluläre Kommunikation mittels elektrischer und metabolischer Kopplung benachbarter Zellen und tragen damit zur Entstehung von funktionsfähigen Geweben und Zellverbänden aus einzelnen Zellen bei. Diese Kommunikation der Zellen wird auch als Gap-Junctional Intercellular Communication bezeichnet (GJIC) (Goodenough et al., 1996; Segretain und Falk, 2004). Ein GJ-Kanal hat eine Länge von 10 – 15 nm und einen Porendurchmesser von 1,25 - 2 nm (Loewenstein, 1981; Perkins et al., 1997; Dhein, 2002) und ermöglicht durch die Verbindung der Zellen einen passiven Transport von Ionen und kleinen Molekülen bis zu einer maximalen Größe von 1000 Da, wie cAMP, IP<sub>3</sub>, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Kumar und Gilula, 1996; Giepmans, 2004; Danesh-Meyer und Green, 2008). Diese Kommunikation beeinflusst eine Vielzahl von verschiedenen Zellfunktionen und hat für die Existenz des Organismus eine essentielle Bedeutung. Über diese Kanalstrukturen werden neben wichtigen Nährstoffen auch chemische und elektrische Signale ausgetauscht sowie die Erregungsausbreitung im Herzen und dem zentralen Nervensystem ermöglicht. GJ sind dynamische, multifunktionelle Kanäle, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Wachstums, der Entwicklung und der Differenzierung der einzelnen Zellen und des gesamten Gewebes spielen (Goodenough et al., 1996). Von besonderer Bedeutung sind die interzellulären Kanalstrukturen bei der Versorgung von Zellen, die nicht direkt an das Blutgefäßsystem angeschlossen sind und somit auf den Nährstoffaustausch mit benachbarten Zellen angewiesen sind. Connexin-Kanäle sind dennoch nicht nur eng in die Entwicklung und Physiologie des Organismus eingebunden, sondern spielen auch eine Rolle in der Pathologie der Zellen und Gewebe (Harris, 2001).

Fast alle Zellen von Invertebraten und Vertebraten kommunizieren über GJ. Bei den Wirbeltieren gibt es nur wenige differenzierte Zellen, die keine GJ ausbilden. Zu diesen zählen neben den Erythrozyten, den Skelettmuskelzellen und den



zirkulierenden Lymphozyten auch die Spermien (Kumar und Gilula, 1996; Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003).

GJ stellen sich mikroskopisch als Regionen dar, in welchen die Plasmamembranen benachbarter Zellen bis auf einen Spalt („gap“) von 2-3 nm zusammengedrückt sind (Benedetti und Emmelot, 1965; Revel und Karnovsky, 1967; Loewenstein, 1981), hieraus leitet sich auch der für die Kanalstruktur gebräuchliche Name „Gap-Junction“ ab. Diese Kanalstrukturen finden sich in der Plasmamembran der Zelle in der Regel in einer dicht gepackten Anordnung, was als GJ-Plaques bezeichnet wird.

Ein GJ-Kanal setzt sich aus 2 End-zu-End zusammengelagerten hexameren Strukturen zusammen, die als Halbkanäle oder Connexone bezeichnet werden (Goodenough, 1975; Makowski et al., 1977; Unwin und Zampighi, 1980; Cascio et al., 1990), wobei jede Zelle jeweils nur einen Halbkanal ausbildet und erst die Zusammenlagerung zweier Zellen mit je einem Connexon zur Ausbildung eines vollständigen GJ-Kanals führt. Jeder Halbkanal wiederum setzt sich aus 6 Untereinheiten, den Connexinen, zusammen (Yeager und Nicholson, 1996; Saez et al., 2005). Im immaturren Hoden lassen sich ovale bis längliche GJ zahlreich an den Zellgrenzen der Sertoli-Vorläuferzellen beobachten. Mit Beginn der Pubertät und der damit einhergehenden Ausbildung der BTB und der terminalen Differenzierung der Sertoli-Zellen kommt es zur Reduzierung der GJ Anzahl und zur Verlagerung von adluminal in das basale Kompartiment in den Bereich des „Sertoli-Sertoli-junctional-Komplex“ (Gilula et al., 1976; Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001).

### 2.4.2.2 Connexone

Connexone sind hexagonale Strukturen, welche die Untereinheiten der GJ-Kanäle bilden und je einen Halbkanal darstellen. Diese Halbkanäle werden in der Membran verschiedener Zellen exprimiert und erst die Zusammenlagerung zweier Zellen, die je einen Halbkanal ausbilden, führen zur Entstehung eines funktionsfähigen GJ-Kanals (Goodenough et al., 1996). Connexone wiederum setzen sich aus Connexinen zusammen, wovon sich je 6 Connexine zu einem Halbkanal mit einer zentralen hydrophilen Pore zusammenlagern. Die einzelnen Halbkanäle haben einen Durchmesser von ca. 7 nm und eine von der jeweiligen Isoform abhängigen Länge von ca. 8,5 bis 12,5 nm (Harris, 2001). Bei den verschiedenen Spezies gibt es eine

unterschiedliche Anzahl von Connexin-Isoformen und fast jedes Gewebe ist in der Lage mindestens eine dieser Isoformen im Laufe seiner Entwicklung zu exprimieren (Mese et al., 2007). Somit treten in den verschiedenen Geweben sowohl Connexone auf, die aus 6 identischen Connexinen bestehen und als homomer bezeichnet werden, sowie Connexone, die sich aus verschiedenen Connexinen zusammensetzen, welche als heteromer bezeichnet werden (Abb. 5) (Willecke et al., 2002; Mese et al., 2007). Diese verschiedenen Zusammensetzungen können die Permeabilität der Connexone beeinflussen und ermöglichen komplexe Regulationsmechanismen der interzellulären Kommunikation (White und Bruzzone, 1996; Willecke und Haubrich, 1996). So zeigten Bevans et al. (1998) erstmals in ihrer Untersuchung an homomeren Cx32 Kanälen und heteromeren Cx32/Cx26 Kanälen eine selektive Permeabilität für cAMP und cGMP. Sie postulierten, dass Cx26 zu einer Verengung der zentralen Pore führt und auf diese Weise die Permeabilität für cAMP wesentlich stärker verringert wurde als die für cGMP. Ebenso haben Studien von Goldberg et al. (2002) gezeigt, dass Adenosin 12-fach besser Cx32 Kanäle als Cx43 Kanäle passieren kann. Im Gegensatz dazu können AMP und ADP 8-fach und ATP sogar mehr als 300-fach einfacher Cx43- als Cx32-GJ-Kanäle passieren (Goldberg et al., 1999; Goldberg et al., 2002; Goldberg et al., 2004).

Weiterhin können sich bei der Zusammenlagerung zweier Connexone entweder 2 identische Halbkanäle zu einem GJ-Kanal zusammenlagern, was als homotypisch bezeichnet wird oder ein GJ besteht aus 2 unterschiedlichen Connexonen, was als heterotypisch bezeichnet wird (Abb. 4) (Willecke et al., 2002; Mese et al., 2007). Da nicht jedes Gewebe alle Isoformen der Connexinfamilie exprimiert, besteht die Möglichkeit, dass benachbarte Gewebe zwar in der Lage sind Connexone in der Plasmamembran der Zellen auszubilden, aber bei der Zusammenlagerung mit anderen Geweben bzw. Kompartimenten die homomeren Halbkanäle keine funktionellen heterotypischen GJ-Kanäle ausbilden (Elfgang et al., 1995; Dhein, 1998).

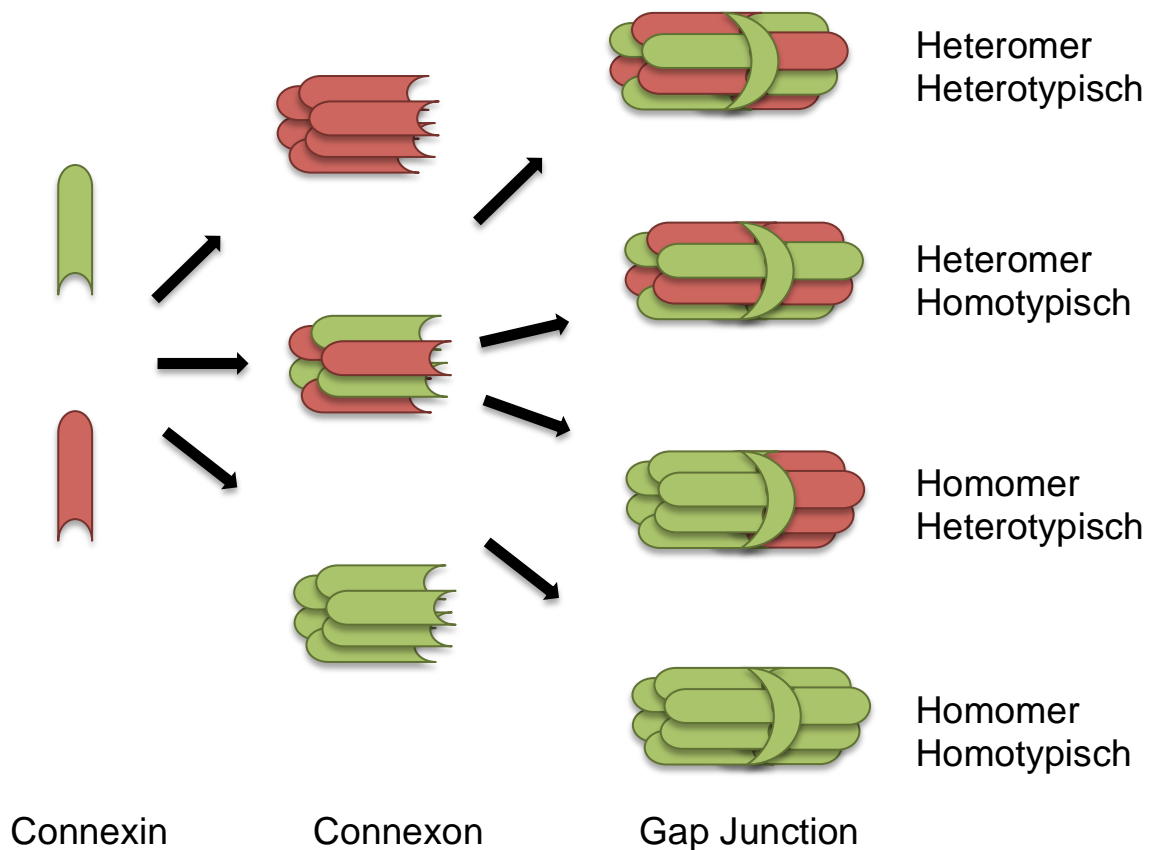


Abb. 4 Schematische Darstellung von Gap-Junction Kanälen:

Sechs Connexine lagern sich zu einem Halbkanal zusammen, der als „Connexon“ bezeichnet wird. Diese wiederum bilden in Kombination mit einem zweiten Connexon einer anderen Zelle einen Gap-Junction Kanal. Verschiedene Connexine können miteinander interagieren, um homomere, heteromere sowie homotypische und heterotypische Kanäle zu bilden, die sich in ihrer Zusammensetzung und Anordnung der Connexin-Untereinheiten unterscheiden, modifiziert nach Mese et al. (2007).

#### 2.4.2.3 Connexine

Connexine (Cx) sind eine Gruppe von Transmembranproteinen mit hoher genetischer Homologie (Beyer et al., 1990; Bruzzone et al., 1996). Innerhalb der Cx-Familie treten je nach Spezies eine unterschiedliche Anzahl von Isoformen auf. So konnten in der Maus 20 und im Menschen 21 verschiedene Isoformen gefunden werden (Söhl und Willecke, 2004). Für die Spezies Hund sind bis jetzt fünf verschiedene Cx bekannt, Cx26, Cx36, Cx40, Cx43 und Cx45 (Cruciani und Mikalsen, 2005). Jedes Cx zeigt eine gewebe- bzw. zellspezifische Expression, wobei die meisten Gewebe bzw. Zellen mehr als eine Isoform ausbilden können.

Dabei werden bestimmte Cx in Zellen von vielen verschiedenen Geweben exprimiert, andere können wiederum nur in wenigen Geweben nachgewiesen werden (Oyamada et al., 2005). So konnten in einer Studie an Ratten mittels RT-PCR an Tubuli seminiferi RNA 11 verschiedene Cx (Cx-26, -31, -31.1, -32, -33, -37, -40, -43, -45, -46 und -50) nachgewiesen werden (Risley, 2000). Cx übernehmen regulierende Aufgaben in der embryonalen Entwicklung, der koordinierten Kontraktion erregbarer Zellen, der Gewebekomöostase sowie des Zellwachstums und der Zellentwicklung (Saez et al., 2003; Söhl und Willecke, 2004; Laird, 2006) und sind somit ein wichtiger Bestandteil des funktionierenden Organismus. Mutationen in den Cx-Genen können hingegen mit unterschiedlichen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Bergoffen et al., 1993; Gong et al., 1997; Kelsell et al., 1997; Laird, 2006).

### 2.4.2.3.1 Nomenklatur

Die am häufigsten verwendete Nomenklatur für die verschiedenen Isotypen der Connexinfamilie basiert auf der Abkürzung Cx für Connexin und der aus der cDNA Sequenz abgeleiteten relativen Molekülmasse des Proteins angegeben in Kilodalton (Beyer et al., 1990). Zur weiteren Differenzierung kann vor die Abkürzung Cx noch der erste Buchstabe der Spezies gestellt werden. Das Beispiel hCx43 bezeichnet somit das humane Connexin mit einem Molekulargewicht von 43 kDa.

Eine weitere Möglichkeit der Benennung besteht in der Unterteilung der Connexinfamilie in die Subgruppen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Diese Gruppeneinteilung orientiert sich an der genetischen Herkunft und der Sequenzhomologie sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene (Gimlich et al., 1990; Risek et al., 1990; Eiberger et al., 2001). Um die unterschiedlichen Connexine einer Subgruppe unterscheiden zu können, werden der griechischen Beschriftung noch römische Zahlen basierend auf der Reihenfolge der Entdeckung hinzugefügt (Harris, 2001). Daraus ergibt sich für das in der zuerst beschriebenen Nomenklatur als Cx43 bezeichnete Connexin, hier die Bezeichnung GJA1. Wobei GJ als Abkürzung für Gap-Junction, das A als Synonym für die Subgruppe  $\alpha$  steht und die 1 anzeigt, dass das Connexin 43 in der Gruppe  $\alpha$  als erstes beschrieben wurde. Zum weiteren Vergleich steht die Bezeichnung GJA3 für das Cx26 sowie GJA7 für das Cx45. Diese zweite Form der Nomenklatur wird häufig im Zusammenhang mit der Bezeichnung für das kodierende Gen des entsprechenden Cx verwendet.

### 2.4.2.3.2 Proteinstruktur und Lokalisation

Trotz der signifikanten Unterschiede in der Länge der einzelnen Cx-Proteine, die primär durch Veränderungen im zytoplasmatischen Anteil verursacht werden, zeigen die verschiedenen Isoformen zahlreiche Gemeinsamkeiten. So hat jedes einzelne Cx-Protein vier hydrophobe transmembranäre Regionen, die als M1 bis M4 bezeichnet werden. Sowohl M1 und M2, als auch M3 und M4 werden jeweils über eine extrazelluläre Schleife (E1 und E2) verbunden. Der Amino- (N-) und der Carboxy- (C-) Terminus sind ebenso wie die hydrophile intrazelluläre Schleife (I1) zwischen M2 und M3 von der zytoplasmatischen Seite erreichbar. Die Länge des Carboxy-Terminus variiert unter den Cx und ist einer der bedeutsamsten Gründe für die Unterschiede in der Molekülmasse (Bennett et al., 1991; Kumar und Gilula, 1996; Harris, 2001; Willecke et al., 2002). Die 4 transmembranären Domänen M1 bis M4 sowie die beiden extrazellulären Schleifen E1 und E2 stellen die am stärksten konservierten Regionen des Cx-Proteins dar, wohingegen die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus die stärkste Sequenzvariabilität aufweisen.

Innerhalb der beiden extrazellulären Schleifen befinden sich jeweils drei Cystein-Reste, die bei der Zusammenlagerung von zwei Connexonen benachbarter Zellen zwischen den gegenüberliegenden Cystein-Resten Disulfid-Brücken ausbilden, um die Bindung der beiden Connexone zu stabilisieren (Goodenough et al., 1996; Harris, 2001; Söhl und Willecke, 2004). In Studien von Dahl et al. konnte gezeigt werden, dass das Ersetzen eines Cysteins durch ein Serin in einem vollständigen Funktionsverlust des mutierten Cx resultiert (Dahl et al., 1991; Dahl et al., 1992).

### 2.4.2.3.3 Connexin 43

Das Cx43 ist das bekannteste Mitglied der Cx-Familie mit einer molekularen Masse von 43 kDa und kommt ubiquitär vor. Die endogene Expression dieses Cx wurde bereits in mindestens 35 verschiedenen Geweben und Zelltypen nachgewiesen (Laird, 2006). Darunter fallen neben den Kardiomyozyten im Herz (Beyer et al., 1987; Darrow et al., 1995; Little et al., 1995), den Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes (Seki und Komuro, 2002), den Keratinozyten und dermalen Fibroblasten der Haut (Kamibayashi et al., 1993; Goliger und Paul, 1994; Zhang et al., 1995), den Granulosazellen des Ovars und den Myometriumzellen des Uterus (Beyer et al.,

1989; Wiesen und Midgley, 1994) ebenso die Leydig- und Sertoli-Zellen des Hodengewebes (Risley et al., 1992; Steger et al., 1999). Das Cx43 ist im Hoden das am häufigsten nachgewiesene GJ-Protein und das einzige das in Leydig-Zellen nachgewiesen werden konnte (Bravo-Moreno et al., 2001). Im Hodengewebe innerhalb der Tubuli seminiferi lassen sich GJ bestehend aus Cx43 zwischen Sertoli-Zellen, zwischen Sertoli-Zellen und Spermatogonien und zwischen Sertoli-Zellen und primären Spermatozyten (Decrouy et al., 2004; Rüttinger et al., 2008) sowie im Interstitium in den Leydig-Zellen nachweisen (Bravo-Moreno et al., 2001). Zu unterscheiden ist hierbei, dass zwischen benachbarten Sertoli-Zellen ein bidirektionaler Transport stattfindet, während zwischen Sertoli-Zellen und Spermatogonien bzw. primären Spermatozyten lediglich ein unidirektionaler Austausch möglich ist (Decrouy et al., 2004). Die Expression des Cx43 kann nicht nur in adulten Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen nachgewiesen werden, sondern zeigt sich bereits zu Beginn der Trächtigkeit im embryonalen und fetalen Hoden und entwickelt sich weiter über die neonatale und präpubertäre Phase (Bravo-Moreno et al., 2001; Perez-Armendariz et al., 2001). Keimzellen hingegen exprimieren Cx43 mRNA im Vergleich zu Sertoli-Zellen erst später im basalen Bereich der Tubuli seminiferi (Batias et al., 2000).

In verschiedenen neueren Studien konnte unter Verwendung von Cx43 knockout Mäusen sowie verschiedenen transgenen knockin Mäusen (Cx43 knockin Cx32, Cx43 knockin Cx40, Cx43 knockin Cx26) gezeigt werden, dass sich homozygote defiziente Cx43 (-/-) Mäuse bis zur Geburt normal entwickelten, aber aufgrund einer Herzmissbildung unmittelbar post partum versterben (Reaume et al., 1995). In histologischen Untersuchungen des Hodengewebes dieser Mäuse zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp -Mäusen (+/+) ein vermindertes Körper- und Hodengewicht, wobei letzteres durch einen Mangel an Keimzellen verursacht zu sein scheint (Juneja et al., 1999). Mittels der knockin Mäuse, bei welchen das Gen für Cx43 durch das Gen eines anderen Cx ersetzt wurde, konnten zwar lebensfähige Tiere erzeugt werden, diese waren aber ebenso infertil wie die knockout Mäuse. Dies zeigt, dass es nicht möglich ist, Cx43 durch andere Cx vollständig zu ersetzen (Plum et al., 2000; Winterhager et al., 2007).

Um den Umstand des unmittelbaren post partalen Todes der Cx43 knockout Mäuse zu umgehen und die direkten Auswirkungen speziell auf das Hodengewebe zu untersuchen, beschäftigen sich neuere Technologien mit konditionalen knockouts,

bei denen Gene gezielt in bestimmten Organen oder Geweben ausgeschaltet werden können. So konnten in 2 verschiedenen Studien spezifische Sertoli-Zell-Cx43 knockout Mäuse erzeugt werden (Brehm et al., 2007; Sridharan et al., 2007). Bei diesen Mäusen zeigte sich zwar ein normaler Descensus testis und eine normale Entwicklung des Urogenitaltraktes, aber auch hier konnten eine Reduktion der Hodengröße und des Hodengewichts sowie ein Arrest der Spermatogenese auf der Ebene der Spermatogonien sowie „Sertoli-cell-only“ Tubuli festgestellt werden, was die Bedeutung von Cx43 für die normale Spermatogenese und Hodenentwicklung unterstreicht (Brehm et al., 2007). Weiterhin zeigten sich bei den SCCx43 knockout Mäusen eine verlängerte Proliferation der Sertoli-Zellen sowie eine verminderte Sertoli-Zelldifferenzierung. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Cx43 eine wichtige hemmende Rolle in der Steuerung der Sertoli-Zellproliferation übernimmt und essentiell ist für die normale terminale Differenzierung (Sridharan et al., 2007). Im Bezug auf die BTB konnte kein Integritätsverlust durch diesen konditionalen knockout gezeigt werden. Diese Mäuse zeigten weiterhin eine voll ausgebildete und funktionell intakte BTB. Dennoch konnte in Untersuchungen von Carette et al. (2010) gezeigt werden, dass es gleichzeitig mit der Reduzierung von Cx43 und einem damit verbundenen Abfall der GJ-Kopplung zwischen den Zellen zu einer Erhöhung der Spiegel von Proteinen wie Occludin und N-Cadherin kommt, welche die Grundlage für Tight- und Adherend-Junctions darstellen. Dies lässt den Schluss zu, dass möglicherweise die Expression von Cx43 zur Kontrolle und Downregulation von Tight- und Adherens-Junctions führt. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass die basalen Keimzellen innerhalb der SCCx43  $-/-$  Tubuli nicht in der Lage waren, die BTB zu passieren, um die weitere Differenzierung zu durchlaufen. Dies führt zu der Annahme, dass Cx43 zwar keine essentielle Rolle bei der Integrität der BTB spielt, aber als zentrales Molekül in den dynamischen Auf- und Abbau der BTB involviert ist. Dieser permanente Verschluss der BTB könnte somit als Ursache für die gestörte Spermatogenese der SCCx43  $-/-$  Mäuse gesehen werden. Diese Erkenntnisse zu den unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen der einzelnen Bestandteile der BTB erläutern die physiologische Bedeutung der Coexistenz innerhalb dieser Barriere. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Untersuchungen in Bezug auf die Steroidogenese kein Effekt auf die Zahl oder funktionelle Aktivität der Leydig-Zellen bzw. die peripheren Testosteronkonzentrationen, was darauf hindeutet, dass Cx43 keine essentielle Rolle für die Androgenproduktion spielt (Kahiri et al., 2006).

Untersuchungen über die Cx43-Expression am Hodengewebe von Mann und Ratte konnten eine stadienspezifische, immunopositive Reaktion zirkulär oberhalb der Spermatogonien und unterhalb der primären Spermatozyten zwischen Sertoli-Zellen nachweisen mit einer deutliche Reduktion des Signals in dem Stage, in welchem die Spermatozyten in das adluminal Kompartiment einwandern (Risley et al., 1992) (Stage II und III (Steger et al., 1999); Stage IX und X (Decrouy et al., 2004)). Diese Wanderung der Spermatozyten führt zu einer temporären Modifikation der BTB wodurch das reduzierte Signal in diesen Stadien des Keimepithelzyklus erklärt wird (Steger et al., 1999; Decrouy et al., 2004). Die ersten Untersuchungen zu Cx43 an präpubertärem und adultem, caninem Hodengewebe zeigten im präpubertären Hoden im Sertoli-Zellzytoplasma lediglich eine deutliche mRNA-, aber keine bzw. nur eine sehr schwache Proteinexpression. Ein deutliches Signal war jedoch sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den interstitiellen Leydig-Zellen nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigten die Untersuchungen am adulten Hodengewebe eine deutliche Immunoreaktivität auf der Ebene der BTB apikal der Spermatogonien und basal der primären Spermatozyten sowie eine starke Immunfärbung in den interstitiellen Leydig-Zellen (Rüttinger et al., 2008).

### 2.4.2.4 Lebenszyklus der Gap-Junctions

Cx haben eine kurze Halbwertszeit; diese liegt in Abhängigkeit vom Gewebe zwischen 1,5 und 5 h (Fallon und Goodenough, 1981; Laird et al., 1991; Beardslee et al., 1998) und erklärt sich durch die Möglichkeit der schnellen Reaktion auf den physiologischen Bedarf der einzelnen Zellen und Gewebe über eine Hoch- oder Runterregulierung der GJ-Kopplung der Zellen (Laird, 2006). Eine weitere Rolle könnte die kurze Halbwertszeit beim Umbau der GJ-Verteilung in der Reaktion auf pathophysiologische Prozesse spielen (Beardslee et al., 1998).

Der Lebenszyklus von Membranproteinen ist ein komplexer Prozess und beinhaltet die Oligomerisierung der Untereinheiten zu den Connexonen, die Translokation in die Zellmembran, die interzelluläre Kontaktaufnahme der Halbkanäle und die Akkumulation der einzelnen Kanäle, um einen morphologisch nachweisbaren GJ-Plaque zu bilden (Laird et al., 1995). Wie alle klassischen Integralproteine werden auch die Cx co-translational in die Membran des endoplasmatischen Retikulums eingefügt (Falk et al., 1994). Die einzige Ausnahme bildet das Cx26, da hier auch

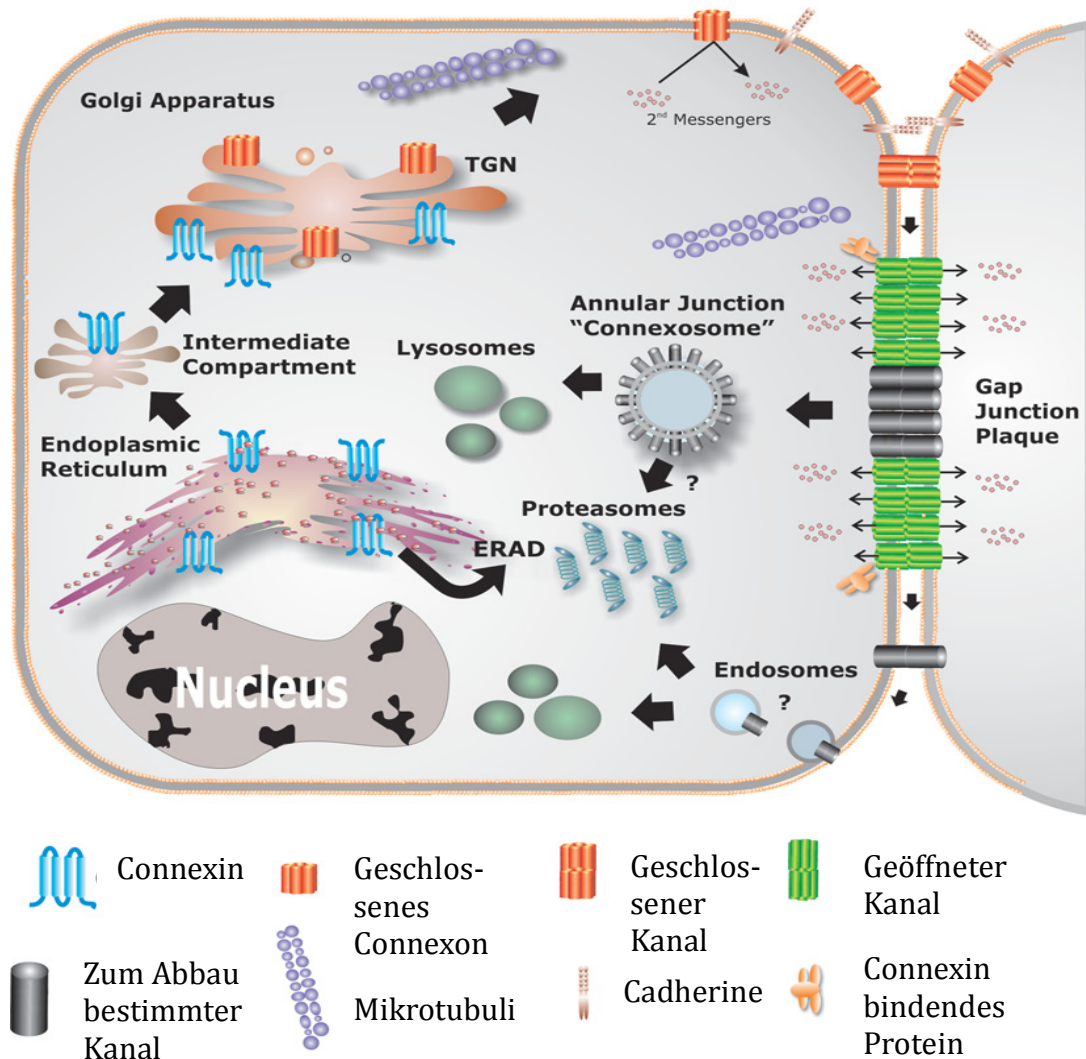


eine post-translationale Einfügung möglich ist. In verschiedenen Studien wird eine Oligomerisierung der Cx im endoplasmatischen Retikulum beschrieben. Andere Studien, besonders Bezug nehmend auf Cx43 und Cx46, konnten Cx-Monomere im Golgi-Apparat nachweisen und gehen als Folge dessen von einer Oligomerisierung im trans-Golgi-Netzwerk aus (Musil und Goodenough, 1993; Koval et al., 1997). Unabhängig davon, wo die Oligomerisierung der Connexone vervollständigt wird, befinden sich die entstehenden Halbkanäle in geschlossenem Zustand, um die Integrität der intrazellulären Kompartimente zu wahren (Laird, 2006). Um die Plasmamembran zu erreichen, findet bei den meisten Cx eine Passage durch den Golgi-Apparat statt (Musil und Goodenough, 1993; Laird et al., 1995; Koval et al., 1997; VanSlyke und Musil, 2000). Die einzige Ausnahme bildet das Cx26, bei welchem auch ein Golgi-Apparat unabhängiger Weg möglich ist (George et al., 1999; Martin et al., 2001). Der Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran findet mittels heterogenen vesikulären post-Golgi Carriern entlang von Mikrotubuli statt (Lauf et al., 2002; Thomas et al., 2005). Diese Mikrotubuli sind für den Transport zur Plasmamembran nicht essentiell, erleichtern diesen aber und erhöhen die Effektivität (Abb. 5) (Laird, 2006). Nachdem die Connexone in die Plasmamembran eingefügt sind, diffundieren sie frei in der Lipidschicht (Thomas et al., 2005). In elektronenmikroskopischen Studien konnten als annuläre GJ bezeichnete, intrazelluläre vesikuläre Strukturen, die von einer Doppelmembran umgeben sind, beobachtet werden (Marquart, 1977; Archard und Denys, 1979; Larsen et al., 1979). Aufgrund ihrer Funktion werden diese Strukturen auch als „Connexosome“ bezeichnet, dennoch können sie wegen ihrer Größe und Struktur nicht als klassische Endosomen oder Phagosomen charakterisiert werden (Laird, 2006). Da Connexosome nicht in allen Zellen nachgewiesen werden konnten, ist eine Internalisierung der Connexone über den klassischen endosomalen Mechanismus ebenso möglich (Laird, 2006).

Die Mehrheit der Mitglieder der Cx-Familie sind Phosphoproteine, deren Phosphorylierung einen wichtigen Bestandteil im reibungslosen Ablauf des Lebenszyklus und der interzellulären Kommunikation der einzelnen Cx darstellt. Dabei spielt die Phosphorylierung eine Rolle bei der Cx-Biosynthese, beim Einbau in die Zellmembran, beim Abbau und der Internalisierung sowie beim Öffnungs- und Schließungsvorgang der Kanäle (Bruzzone et al., 1996; Saez et al., 2003; Solan und Lampe, 2005). Die Phosphorylierung der meisten Cx findet am zytoplasmatisch

gelegenen C-terminalen Ende des Membranproteins statt (Lampe und Lau, 2000, 2004). Die einzige Ausnahme bildet das Cx26, da durch das sehr kurze C-terminale Ende keine Phosphorylierung stattfinden kann (Traub et al., 1989).

### The Connexin Life Cycle



**ERAD** ER assoziierte Abbau **TGN** trans-Golgi-Netzwerk

Abb. 5 Lebenszyklus der Connexine, Biochemical Journal (2006) 394, 527-543 – Dale W. Laird, [www.biochemj.de](http://www.biochemj.de)

#### 2.4.2.5 Öffnungszustand der Gap-Junctions

Der Öffnungszustand der GJ-Kanäle ist abhängig von verschiedenen Parametern, wie z.B. Ionen (Bruzzone et al., 1996). Eins der Ionen, das für die Regulation verantwortlich gemacht wird, ist Calcium. So folgt auf eine Erhöhung der Calcium-

Konzentration in den unphysiologischen Bereich eine reduzierte GJ-Kommunikation (Loewenstein, 1981; Kumar und Gilula, 1996). Einen weiteren Regulationsmechanismus stellt der pH-Wert dar. Dieser führt bei einer intrazellulären Erniedrigung zu einem Verschluss der Kanäle (Saez et al., 1990; Bruzzone et al., 1996). Der Mechanismus des Gating-Vorgangs der GJ erfolgt zumeist über die Phosphorylierung einzelner Cx.

Zum Ablauf der Schließung und Öffnung der GJ-Kanäle werden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Das 1. Modell ist die Rotationstheorie. Hierbei gehen die Autoren davon aus, dass die einzelnen Cx schon im geöffneten Zustand im Bezug auf die Achse des Connexons schräg nach links geneigt vorliegen. Beim Verschluss der Pore kommt es nun durch eine radiale Einwärtsbewegung der Untereinheiten zu einer Verminderung der Schrägstellung und damit zu einem Verschluss der Pore (Unwin und Zampighi, 1980; Unwin und Ennis, 1983).

Das zweite Modell folgt der Vorstellung von einem „Ball-und-Kette-System“. Hierbei agiert das cytoplasmatische Carboxy-Ende des Cx als beweglicher Partikel („der Ball“), der über eine flexible Proteinkette („die Kette“) mit den membran-durchspannenden Regionen verbunden ist. Unter normalen Bedingungen befindet sich der flexible Partikel nicht im Bereich der Pore. Durch einen Stimulus kommt es zu einer Lageveränderung des C-terminalen Endes, dieses bindet an eine separate Region des Proteins und führt nun zum Verschluss der hydrophilen Pore (Liu et al., 1993; Ek et al., 1994; Calero et al., 1998; Delmar et al., 2004).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material/Gewebe

In dieser Arbeit wurde canines Hodenmaterial von insgesamt 37 Rüden untersucht, von welchen 23 zuvor mittels eines slow-release GnRH-Agonist Implantats (Gonazon®, 18,5 mg Azagly-Nafarelin, Intervet, Angers Technopole, France) behandelt wurden. Nach Ablauf einer 5-monatigen Wirkungsdauer wurde das Implantat wieder entfernt und 3 bis 4 Hunde wurden im Abstand von jeweils 3 Wochen (Woche 0-24) chirurgisch kastriert. Im Anschluss wurden diese Hunde zum einen anhand von histologischen Merkmalen in 4 Entwicklungsgruppen (developmental groups (DG)) eingeteilt (Tabelle 1). Hierbei ergab sich unter Berücksichtigung der in den Tubuli seminiferi am weitesten entwickelten Keimzellen folgende Einteilung:

- DG A: Spermatozyten
- DG B: runde Spermatiden
- DG C: elongierende Spermatiden
- DG D: elongierte Spermatiden mit vollständiger Spermatogenese

Zum anderen erfolgte eine Einteilung nach dem Kastrationszeitpunkt in die Wochengruppen (Wo) 0, 3, 6, 9, 12 und 24. (Tabelle 2) (Die Wo15, -18 und -21 fanden hierbei wegen biologischer Übereinstimmung mit den Wo12 und -24 keine weitere Berücksichtigung). Um diese Einteilung zu ermöglichen, wurden 2 Hunde ausgeschlossen, die zum zweiten Mal mit einem GnRH-Implantat behandelt wurden (Elias, Joni).

Als Kontrolle diente Hodengewebe von 5 adulten Rüden mit vollständiger Spermatogenese sowie von 3 juvenilen, präpubertären Rüden. Um den Einfluss des Implantates zu untersuchen wurde weiterhin Hodengewebe von je 3 Hunden verwendet, die 5 Monate vor der Kastration entweder mit einem Suprelorin®-Implantat (Wirkstoff 4,7 mg Deslorelin, Virbac Tierarzneimittel GmbH, D) oder mit einem Profact®-Depot-Implantat (Wirkstoff 6,3 mg Buserelinacetat, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, D) behandelt wurden, was jeweils der Wo0 im Vergleich zu den mit Gonazon® (Wirkstoff 18,5 mg Azaglu-Nafarelin, Intervet, Angers Technopole, France) behandelten Hunden entsprach (Tabelle 3). Zum Zeitpunkt der chirurgischen Kastration wurde das Hodengewebe in RNA Later zur mRNA- und Protein-

Aufarbeitung sowie in Formol nach Lillie und Bouin'scher Lösung wie bei Gentil (2012) beschrieben fixiert.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Hunde nach histologischen Kriterien der am weitesten entwickelten Keimzellen („Developmental Groups“(DG))

Gruppe	Anzahl	Hunde
DG A	4	Elias, Nick, Percy, Luca
DG B	3	Leo Boes, Joni, Theo Hoffmann
DG C	6	Speedy, Spikey, Snoopy, Strolch, Leo Stürmer, Mortimer
DG D	5	Bruno, Shy, Berry, Feivel, Sydney

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Hunde nach Kastrationszeitpunkt

Gruppen	Anzahl	Hunde
Woche 0	3	Nick, Percy, Luca
Woche 3	3	Leo Boes, Theo Hoffmann, Speedy
Woche 6	4	Spikey, Snoopy, Strolch, Leo Stürmer
Woche 9	3	Mortimer, Bruno ,Joschi Faquet,
Woche 12	3	Shy, Captain Kirk, Elliot
Woche 24	3	Sydney, Theo Jentsch, Joschi Plefka

Tabelle 3: Kontrollgruppen

Gruppen	Anzahl	Hunde
Juvenil (JG)	3	Jack, William, Averell
Adult (CG)	5	Ben, Tom, Charly, Soto, Horst
Profact® Depot	3	Sid, Hansi, Floh
Suprelorin®	3	Jan, Bruce, Findus

#### 3.2 Sertoli-Zellkerngröße

##### 3.2.1 Vimentin-Färbung der Sertoli-Zellen

Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte an formolfixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten. Am Tag vor dem Versuchsbeginn wurden Gewebeschnitte jedes Hundes von den gekühlten Paraffinblöcken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms RM 2125 RT, Fabr.-Nr. 8493/092004 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D) in einer Dicke von 3 µm angefertigt und bei Raumtemperatur über Nacht vollständig trocknen gelassen.

Für die Immunhistochemie wurde als Primärantikörper ein Vimentin-Antikörper Clone V9 (monoklonaler Maus-anti-human; Dako Deutschland GmbH, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:2000 angewendet. Ein biotinylierter polyclonaler Ziege-anti-Maus Antikörper (Dako Deutschland GmbH, Hamburg), 1:250 verdünnt, diente als Sekundärantikörper. Das immunhistochemische Protokoll wurde durchgeführt, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben mit den folgenden Abwandlungen: als Waschpuffer diente Tris-HCL-Puffer, die Inkubation mit 10%igem Ziegenserum verdünnt in BSA-Blockingpuffer erfolgte über 30 Minuten, die Inkubation des Sekundärantikörpers über 45 Minuten, die Visualisierung des Signals wurde über 8 Minuten mit AEC Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) durchgeführt und im Anschluss erfolgte eine 20-sekündige Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Goericke-Pesch et al., 2009).

##### 3.2.2 Messung der Sertoli-Zellkerne

Um die Sertoli-Zellen ausmessen zu können wurden von jedem Vimentin-gefärbten Schnitt mittels eines Durchlichtmikroskops inklusive Kamera der Firma Leica (Wetzlar) in der 200 x Vergrößerung Bilder angefertigt. Hierfür wurde ein DELL PC mit Bildschirm und die Software Leica Image Manager IM1000 V.1.20 verwendet. Alle Fotos und Messungen wurden innerhalb einer Woche angefertigt und durchgeführt, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen. Für die Auswertung wurden die Schnitte mäanderförmig durchmustert und nur Tubuli digitalfotographisch festgehalten, die eine annähernd runde Form aufwiesen. Nach Einstellen eines Tubulus mittels des Mikroskops und der Software IM1000 wurde mit

dem Befehl „Bildeinzug“, „Bildquelleneinstellungen“ das Sichtfeld übertragen. Dann wurde mittels des Buttons „Einziehen“ der eingestellte Bildausschnitt auf dem Computer abgespeichert. An den Bildern wurden pro Hund 100 Sertoli-Zellkerne mittels des Standard-Messmoduls des Programms vermessen. Dabei wurden nur solche Zellen vermessen, die folgende Kriterien aufwiesen (Foote et al., 1972; Aumüller et al., 1988; Lebelo und van der Horst, 2010):

- Vimentin-gefärbtes Zytoplasma
- ovaler Zellkern
- deutlich sichtbarer Nukleolus
- der Basalmembran aufliegend

Um die beiden im Folgenden zu messenden Strecken kombinieren zu können, wurde bei der Streckenmessung die Einstellung für mehrfache Vektormessung auf 2 geändert. Nun wurde bei jeder Zelle der Längsdurchmesser (a) und der Querdurchmesser (b) in  $\mu\text{m}$  erfasst, wobei darauf geachtet wurde, dass die beiden Messlinien a und b annähernd im rechten Winkel zueinander standen.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel. Dabei wurden die beiden gemessenen Strecken in Excel übertragen und die Fläche A der einzelnen Zellkerne näherungsweise mit der Formel 1 berechnet:

$$A = \frac{1}{2} a \times \frac{1}{2} b \times \pi \quad (1)$$

Aus den hundert Einzelwerten wurden abschließend für jeden Hund der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  sowie die Standardabweichung (SD) berechnet. Die Mittelwerte dienten wiederum der Berechnung der Gruppenmittelwerte.

#### 3.3 Western-Blot zur Überprüfung der Spezifität des für die Immunhistochemie verwendeten Primärantikörpers

##### 3.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus dem Gewebe

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte, in Aluminiumfolie verpackte Hodengewebe wurde im ersten Schritt mittels eines Hammers zerkleinert. Die entstandenen Gewebestücke wurden direkt in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten, vorgekühlten und sterilen Porzellanmörser überführt und dort unter stetigem Nachfüllen des verdampften

Stickstoffs mittels eines sterilen Pistills zerrieben. Anschließend wurden 200 mg des zerkleinerten Gewebes in einem 2 ml Tube abgewogen und mit 1 ml eiskaltem Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) vermischt. Dieses Gemisch wurde dann 3 x 30 Sekunden mit einem ebenfalls vorgekühlten Ultra Turrax® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D) homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden 50 mg SDS hinzugegeben und das Ganze nach kurzem Vortexen 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Um verbliebene, größere Bestandteile zu separieren, erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 3500 UpM. Der hierbei entstandene Überstand wurde in separate, beschriftete 0,5 ml Tubes aliquotiert und nach Bestimmung der Proteinmenge bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein UV-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg, D) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm in Kunststoff-Einmalküvetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemessen. Hierfür wurde bei dem Photometer das Programm „protein“ gewählt und als Nullwert mittels der Taste „blank“ 98 µl autoklaviertes Aqua bidest. verwendet. Im Anschluss wurde mittels der Taste „Dilution“ die Verdünnung 2 µl Probe + 98 µl Verdünner eingegeben und die 2 µl Probe in die bereits für die Nullwert-Einstellung verwendete Küvette pipettiert und mit der Taste „Sample“ bestätigt.

#### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) – Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht

Für das Gießen des benötigten Polyacrylamid-Mini-Gels der Größe 100 x 105 x 0,75 mm wurde der Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Hoefer® Inc., Holliston, MA, USA) verwendet. Vor Beginn wurden alle Einzelteile der Gel-Sandwich Apparatur gründlich gereinigt, mit 70%igem Ethanol entfettet und anschließend gemäß Herstellerangaben zusammengebaut. Für die Herstellung des 10%igen Trenngels wurde die 30%ige Acrylamid-Stammlösung mit dem vorbereiteten Trenngelpuffer und Aqua bidest. vermischt. Dann erfolgte die Zugabe von 10%iger SDS-Stammlösung, frisch angesetzt 10%igem APS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) und



TEMED (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D). Das so hergestellte, noch flüssige Trenngel wurde sofort unter Vermeidung von Luftblasenbildung bis ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes in die Gelkassette eingefüllt und mit 1 ml Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) überschichtet, um eine Glättung der Gelgrenze zu erreichen und den Kontakt mit Sauerstoff auszuschließen. Um die gewünschte Konsistenz des Gels zu erreichen, fand eine 45-minütige Polymerisation bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und die Reste wurden mit Aqua bidest. ausgespült. Das in der Gelkassette verbliebene Wasser wurde mit einem Stück Filterpapier restlos entfernt. Nachfolgend wurde die Sammelgellösung zur Herstellung des 5%igen Sammelgels angemischt und bis zum oberen Rand der Apparatur eingefüllt. Um im auspolymerisierten Gel die benötigten Probestaschen zu erhalten, wurde in das noch flüssige Sammelgel eine spezielle kammförmige Schablone eingesetzt, die zusätzlich für den nötigen Luftabschluss sorgte. Während der 30-minütigen Polymerisation des Sammelgels fand die Vorbereitung der Proteinproben für die Elektrophorese statt. Hierfür wurden die Arbeitsverdünnungen mit den Proteinkonzentrationen 10 µg/µl (Hund) und 5 µg/µl (Mensch) auf Eis aufgetaut und die benötigte Menge (pro Probestasche 100 – 150 µg Protein) im Verhältnis 3:1 mit Probenpuffer vermischt (insgesamt 12 µl Probenmaterial pro Tasche). Im Anschluss wurden die Proben für 3 Minuten bei 95°C im Wasserbad hitzedenaturiert, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen, und dann auf Eis abgekühlt. Nach Beendigung der Polymerisation des Sammelgels wurde die kammförmige Schablone vorsichtig entfernt, das Gelsandwich aus der Gießvorrichtung entnommen und in die vertikale Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) eingespannt. Dann erfolgte eine Spülung der Probestaschen mit auf 4°C gekühlten 1x Elektrodenpuffer mit gleichzeitigem Befüllen der beiden Kammern der Elektrophorese-Apparatur. Um eine während der gesamten Elektrophorese andauernde Kühlung zu ermöglichen, wurde die Apparatur über ein Schlauchsystem mit einer Pumpe (Thermonix 1419, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) verbunden, die kontinuierlich Eiswasser durch die Elektrophorese-Kammer beförderte. Im Folgenden wurden die vorbereiteten Proteinproben sowie ein Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D) für die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen in die Probestaschen pipettiert. Nach dem Verschließen der Elektrophorese-Kammer wurde die

Elektrophorese bei einer Stromstärke von 15 mA und einer maximalen Spannung von 300 V gestartet. Nachdem die Bromphenolblaulinie die Grenze zwischen Sammelgel zum Trenngel erreicht hatte wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Nach der vollständigen Auftrennung der Proteine nach ca. 80 Minuten wurde die Elektrophorese beendet.

#### 3.3.4 Elektroblothing – Transfer der Proteine auf eine Membran

Im Anschluss an die Elektrophorese fand mit Hilfe der Tank-Blot-Apparatur Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, UK) die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D) statt. Folgende Vorbereitungen waren vor dem Zusammenbau erforderlich: Ein der Gelgröße entsprechend großes Stück PVDF-Membran wurde zugeschnitten und kurz mit Methanol benetzt, um es im Anschluss 20 Minuten in dem bereits angemischten und vorgekühlten Transferpuffer einzuweichen. Weiterhin wurden 4 auf die Größe des Blot-Sandwich zurechtgeschnittene, handelsübliche Haushaltsschwammtücher sowie 4 Mini Trans-Blot-Filterpapiere (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) ebenso für 20 Minuten in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese vorsichtig aus der Gel-Kassette entnommen und das Sammelgel mit den Probestaschen sauber abgetrennt. Anschließend wurde auch das Gel ebenso für 10 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Nachdem die Aquilibration der einzelnen Komponenten des Blot-Sandwichs abgeschlossen war, wurden sie luftblasenfrei in der folgenden Reihenfolge zusammengebaut: 1. die schwarze Seite des zur Apparatur gehörigen Kunststoffgitters, 2. zwei der Schwammtücher, 3. zwei Mini-Trans-Blot-Filterpapiere, 4. das Polyacrylamidgel, 5. eine PVDF-Membran, 6. zwei Mini-Trans-Blot-Filterpapiere, 7. zwei Schwammtücher und 8. die durchsichtige Seite des Kunststoffgitters der Apparatur. Die Bestandteile wurden zusammengepresst und mittels des am Gitter vorhandenen Verschlusses verriegelt. Das Blot-Sandwich und die für die Apparatur vorgesehene „Cooler Unit“ wurden wie vom Hersteller angegeben in die Tank Blot-Apparatur eingehängt und mit 4°C kaltem Transferpuffer aufgefüllt. Die gesamte Apparatur wurde auf einen Magnetrührer (Janke & Kunkel GmbH + Co. KG, IKA-Werke, Staufen, D) verbracht und mit einem Magnetrührstab versehen, um eine stetige Vermischung des Transferpuffers und eine damit

verbundene gleichmäßige Kühlung der Apparatur zu gewährleisten. Nach Abschluss aller Vorbereitungen wurde der Transfer bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von maximal 300 mA gestartet. Nach Ablauf einer Stunde wurde der Transfer beendet, das Sandwich geöffnet und die Membran vorsichtig mit einer Pinzette von dem Gel abgezogen. Diese wurde dann mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben auf ein Filterpapier gelegt und dort für 30 Minuten vollständig getrocknet.

#### 3.3.5 Ponceau-Färbung

Um die Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde im Anschluss an die 30-minütige Trockenphase eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Bei Ponceau S (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) handelt es sich um einen roten Azofarbstoff, der reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet und damit unspezifisch alle auf der Membran vorhandenen Proteine anfärbt.

Nach kurzem Benetzen der Membran mit Methanol wurde diese für 3 Minuten in einer Ponceau-Arbeitslösung, bestehend aus der Ponceau-Stammlösung und Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 geschwenkt. Um die Färbereaktion zu stoppen und überschüssigen Farbstoff zu entfernen, schloss sich eine kurze Waschung mit Aqua bidest. an. Anschließend wurde die Membran in PBS-Puffer vollständig entfärbt.

#### 3.3.6 Nachweisreaktion

Zum Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C im Blocking-Puffer inkubiert und am nächsten Tag nach einem kurzen Waschvorgang in PBST-Puffer mit Avidin (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA) (verdünnt in PBS-Puffer) über eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Wie auch bei allen folgenden Schritten erfolgte die Inkubation auf einem Schüttler mit vollständig durch die entsprechende Lösung bedeckter Membran. Zwischen allen weiteren Schritten wurde die Membran jeweils kurz in PBST-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran über 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Biotin-Lösung (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA) (verdünnt in PBS-Puffer)

und danach über 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blocking-Puffer) inkubiert.

Folgender Primärantikörper wurde verwendet:

- Connexin 43: polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch Antikörper; Cell Signaling Technology® Inc, USA Katalog-Nr. #3512, Verdünnung 1:600

Nach Ablauf der 2-stündigen Inkubationszeit wurde die Membran 3 x 5 Minuten in PBST-Puffer gewaschen, um schwächer haftenden, unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wobei nach jedem Waschvorgang der Puffer erneuert wurde. Danach wurde der Sekundär-Antikörper, ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Vectastain® Elite ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories, Inc; USA), in der Verdünnung 1:1000 in Blocking-Puffer auf die Membran gegeben und diese über 45 Minuten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Sekundär-Antikörper ist spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet und ermöglicht mittels der Bindung an diese Bereiche die Detektion des gebundenen Primärantikörpers. Die Entfernung des ungebundenen Antikörpers erfolgte erneut mit drei 5-minütigen Waschungen in PBST-Puffer.

Zuletzt wurde die Membran über 30 Minuten in einer entsprechend den Herstellerangaben vorbereiteten peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Lösung (aus Vectastain® Elite ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories, Inc; USA) inkubiert. Bei diesem Schritt wurde sich die um mehrere Zehnerpotenzen höhere Bindungsaffinität von Avidin und Biotin im Vergleich zu Antigen und Antikörper zu Nutze gemacht, welche eine Signalverstärkung bedingt. Als Bindeglied zwischen dem spezifischen Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex fungierte der biotinylierte Sekundärantikörper.

Auf die Inkubation in ABC folgte erneut eine dreimalige 5-minütige Waschung in PBST-Puffer. Die Sichtbarmachung der gebundenen Reagenzien erfolgte mittels einer durch NovaRED™ Substrate Kit (Vector® Laboratories, Inc; USA) hervorgerufenen Farbreaktion. Hierfür wurden die einzelnen Lösungen wie vom Hersteller empfohlen unmittelbar vor der Benutzung unter möglichst wenig Lichteinfluss in Aqua bidest. angesetzt. Die Färbung fand unter ständiger visueller Kontrolle und langsamen Schwenken 7 Minuten lang statt. Um die Farbreaktion zu stoppen wurde die Membran in ausreichend Aqua bidest. gewaschen und die Ergebnisse wurden unmittelbar im Anschluss mittels eines Scanners festgehalten.

Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch Blocking-Puffer ersetzt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers oder des Avidin-Biotin-Komplexes abgrenzen zu können; die Probe wurde jedoch in allen weiteren Schritten identisch behandelt. Als Positivkontrolle diente humanes Hodenprotein.

#### 3.4 Immunhistochemie

##### 3.4.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die Durchführung der Immunhistochemie von Connexin 43 erfolgte an bouinfixierten, in Paraffinblöcke eingebetteten Schnitten. Am Tag vor dem Versuchsbeginn wurden Gewebeschnitte jedes Hundes von den gekühlten Paraffinblöcken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms RM 2125 RT, Fabr.-Nr. 8493/092004 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D) in einer Dicke von 3 µm angefertigt und bei Raumtemperatur über Nacht vollständig getrocknet.

##### 3.4.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Objektträger untereinander möglichst zu optimieren, wurden alle Gewebeschnitte an einem Tag im selben Lauf angefärbt. Im ersten Schritt wurden die Schnitte über eine Dauer von 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Hierfür wurden diese für jeweils 2 x 2 Minuten in 99,8%- 96%- und 70%-igem Ethanol inkubiert und anschließend unter fließendem, kaltem Wasser gespült. Um die im Zuge des Fixierungsprozesses über die Quervernetzung der Proteine geschädigte Antigenität wieder herzustellen wurde eine thermische Demaskierung der Antigene durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte 1 x 5 Minuten bei Raumtemperatur in Citratpuffer inkubiert und anschließend für 3 x 5 Minuten in der Mikrowelle bei 560 Watt in vorgeheiztem Citratpuffer gekocht. Im Anschluss wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Citratpuffer belassen und danach für 5 Minuten unter kaltem, fließenden Wasser gespült. Um die Aktivität der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen zu blockieren erfolgte eine 30-minütige Inkubation in 3%-igem Wasserstoffperoxid in Methanol, welcher sich eine 5-

minütige Waschung unter ständigem Rütteln auf dem Schüttler in ICC-Puffer anschloss.

Nach Abschluss aller Vorbereitungen folgte die eigentliche Nachweisreaktion, welche wie schon beim Wester Blot-Verfahren beschriebenen auf folgendem Prinzip beruht:

- Blocking unspezifischer Bindungsstellen
- Bindung des Primärantikörpers
- Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper
- Signalverstärkung durch ein Avidin-Biotin-System
- Visualisierung der gebunden Reagenzien

Die Objektträger wurden aus den Halterungen entnommen und der verbliebene Puffer mittels Abklopfen und Trocknen der Objektträgerunterseite entfernt. Die Fläche direkt um die Gewebeschnitte wurde mittels eines fusselfreien KimTech Tuchs (Kimberly Clark Professional, Dallas, USA) getrocknet und mittels eines DakoPens (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D) vollständig umfahren, um das Auslaufen der in den nächsten Schritten aufzutragenden Reagenzien zu verhindern. Die Schnitte wurden im Anschluss in eine bereits vorbereitete feuchte Kammer verbracht. Bei allen diesen Schritten wurde darauf geachtet, dass es nicht zum Austrocknen des Gewebes kam. Im ersten Schritt des oben beschriebenen Prinzips wurden alle Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 90 µl 10%-igem Ziegenserum in ICC-Puffer beschichtet. Nach Ablauf der 20-minütigen Blockingzeit wurde das Serum mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt und alle Schnitte, mit Ausnahme der Negativkontrollen, wurden mit 90 µl des Primärantikörpers überschichtet und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert.

Folgender Primärantikörper wurde verwendet:

- Connexin 43: polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch Antikörper;  
Cell Signaling Technology, Inc; USA Katalog-Nr. #3512, Verdünnung 1:50

Bei der Negativkontrolle wurde statt des Primärantikörpers folgende Isotypenkontrolle angewendet:

- Rabbit IgG, Proteingehalt 5,0 mg/ml Vector® Laboratories, Inc; USA Katalog-Nr. #I-1000, Verdünnung 1:5000 (1 µg/ml in der Arbeitsverdünnung)

Nach der 19-stündigen Inkubationszeit wurden der Primärantikörper bzw. die Isotypenkontrolle auf ein Papiertuch abgeklopft und die Schnitte 2 x 5 Minuten in ICC-Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte aus

dem Puffer entnommen und die DakoPen-Umrandung mittels eines fusselfreien KimTech-Tuches getrocknet. Bei Bedarf erfolgte eine erneute Umrandung der Schnitte mittels des DakoPens. Um die Voraussetzung für die spätere Bindung des Primärantikörpers an den Avidin-Biotin-Komplex zu schaffen wurden die Schnitte für 30 Minuten mit jeweils 90 µl des folgenden Sekundärantikörpers verdünnt im Ziegenerum inkubiert:

- biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen IgG, Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc; USA, Verdünnung 1:200

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte das Abklopfen des Antikörpers auf ein Papiertuch und wiederum eine Waschung aller Schnitte für 2 x 5 Minuten in ICC-Puffer. Erneut wurden im Anschluss die DakoPen-Umrandungen getrocknet und bei Bedarf nachgezogen. Dann folgte die Übersichtung der Schnitte mit 90 µl des ABC-Systems (aus Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc; USA). Dieses wurde, wie vom Hersteller empfohlen angemischt und 30 Minuten vorinkubiert. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgten das Abklopfen der ABC-Lösung und das 10-minütige Spülen in ICC-Puffer mit dem sich anschließenden Trocknen der DakoPen-Umrandung. Zur Visualisierung der Signale wurden die Schnitte – wie bereits zuvor beim Western Blot beschrieben – mit der nach Herstellerangaben hergestellten Färbelösung NovaRED™ (Vector® Laboratories, Inc; USA) beschichtet. Nach genau 2 Minuten und 15 Sekunden Färbezeit wurden die Schnitte in ein Gefäß mit fließendem Wasser überführt, um die Färbereaktion vollständig zu stoppen. Anschließend wurde für jeden Hund mit vollständiger Spermatogenese jeweils ein Gewebeschnitt und pro Gruppe eine Negativkontrolle für 5 Sekunden in Hämatoxylin (1:1) gegengefärbt und im Anschluss für 5 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Die Schnitte der anderen Tiere und die 2. Schnitte der oben genannten Hunde wurden aufgrund des für die Auswertung angewendeten Programms nicht gegengefärbt.

Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 2 Minuten 96%iger, 1 x 2 Minuten 99,8%iger Ethanol, 2 x 2 Minuten Xylol) dehydriert und dann mittels eines Histo-Kits (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH + Co KG, Sondheim/Rhön, D) eingedeckelt.

#### 3.4.3 Auswertung der Immunhistochemie

Für die semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie wurde das Bildanalyseprogramm „ImageTool“ (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) verwendet. Voraussetzung für die Auswertung mittels der Software war ein ausreichender Kontrast zwischen immunopositiver und immunonegativer Farbreaktion, der in den nicht mit Hämatoxin gefärbten Schnitten erzielt werden konnte.

##### 3.4.3.1 Binarisierung

Um die immunhistochemischen Ergebnisse mittels der Software ImageTool (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) auswerten zu können, wurden die Schnitte wie bereits im Abschnitt 3.2 beschrieben, digitalfotographisch festgehalten. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die Einstellungen „Belichtung“ und „Verstärkung“ im Programm IM1000 sowie die Lichtintensität am Mikroskop bei jedem Bild identisch waren, um eine maximale Vergleichbarkeit der Bilder untereinander zu ermöglichen. Es wurden pro Gewebeschnitt und Hund 20 Tubuli digitalfotographisch festgehalten. Hierfür wurden die Schnitte mäanderförmig durchmustert und nur Tubuli ausgewählt, die eine annähernd runde Form aufwiesen. Diese Bilder wurden auf einen Computer übertragen, der mit der Software „ImageTool“ ausgerüstet war. Hier wurden zunächst die Bilder mittels des Befehls „File“ „Open Image“ geöffnet. Um die Farbreaktion innerhalb des Tubulus zu beurteilen, wurden die einzelnen Tubuli mittels des Befehls „Script“ „Copy Sub Image“ umfahren und ausgeschnitten (Abb. 6/1). Wenn sich innerhalb des Tubuluslumens eine unspezifische Farbreaktion befand, wurde diese nachträglich manuell entfernt. Um die Voraussetzung für die Erzeugung eines Binärbildes zu schaffen, wurden im nächsten Schritt die Farbbilder der ausgeschnittenen Tubuli mittels des Befehls „Processing“ „Color-to-Grayscale“ in ein Graustufenbild umgewandelt (Abb. 6/2). Hierbei wurden den einzelnen Pixeln entsprechend ihrer optischen Dichte Werte zwischen „0“ und „255“ zugeordnet, wobei der Wert „0“ weiß, also maximale Beleuchtung und der Wert „255“ schwarz bzw. keine Beleuchtung entsprach. Im nächsten Schritt wurde mittels des Befehls „Processing“ „Threshold manual“ ein Schwellenwert festgelegt, über welchem das Programm die Pixel als



schwarz und unterhalb als weiß darstellte, wodurch sich ein Bild mit ausschließlich weißen und schwarzen Bildpunkten ergab (Abb. 6/3). Dabei stellten die schwarzen Bereiche die immunpositiven und die weißen Bereiche die immunnegativen Bereiche dar. Der Schwellenwert lag bei den hier ausgewerteten mit einem Cx43-Antikörper gefärbten Schnitten bei 155. Im letzten Schritt wurden mittels des Befehls „Analysis“ „Count Black/White Pixels“ die schwarz bzw. weiß gefärbten Flächen des Tubulus berechnet und tabellarisch dargestellt. Die Prozentzahlen wurden in eine Exeltabelle übertragen und aus den 20 Einzelwerten pro Hund sowie aus den sich daraus ergebenden Werten einer Gruppe, wurden der arithmetrische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (SD) berechnet.

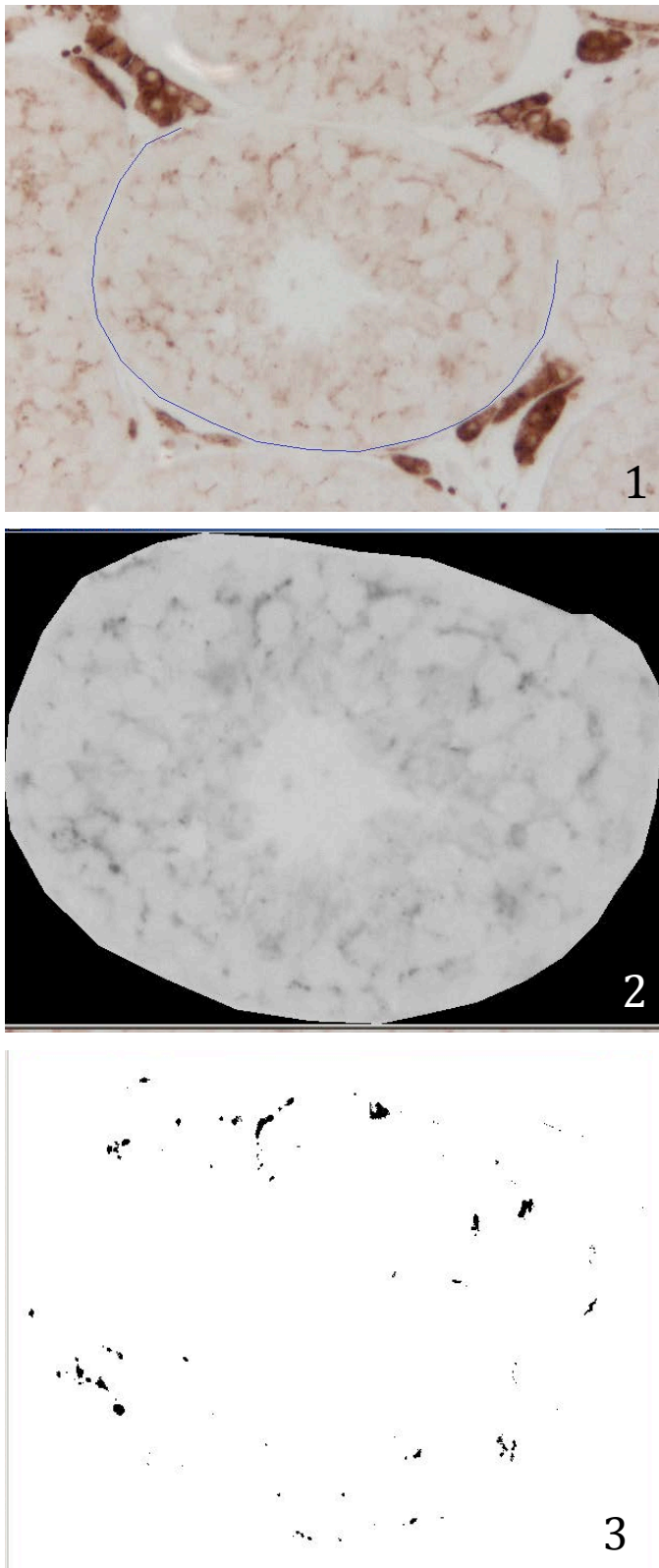


Abb. 6 Beispielhafte Darstellung der Binarisierungs-Schritte mittels ImageTool:  
**1:** Umfahrung der Tubuli semniferi contorti mit der Computerm Maus **2:** Umwandlung  
des Farbbildes in ein Graustufenbild **3:** Umwandlung des Graustufenbildes in ein  
binarisiertes Bild.

#### 3.4.3.2 Grauwertanalyse

Eine weitere Auswertung erfolgte mittels der Grauwertanalyse. Hierfür wurden die auch zur Binarisierung eingesetzten digitalphotographischen Bilder verwendet. Bis zur Stufe der Umwandlung des ausgeschnittenen Farbbildes in ein Graustufenbild wurde verfahren wie im Abschnitt 3.4.3.1 beschrieben. Im nächsten Schritt wurden mittels der Befehle „Analysis“, „Objektanalyse“, „Find Objects“, „Select Thresholding Method“, „Manual“, Bereiche im erzeugten Graustufenbild festgelegt, die das Programm für die Grauwertanalyse berücksichtigen sollte. Die Bereiche verschiedener Graustufen wurden von dem Programm erfasst und mit fortlaufenden Zahlen benannt. Dies erfolgte wie schon bei der Binarisierung über die Festlegung eines Grenzwertes, der, um die Vergleichbarkeit zwischen den beiden beschriebenen Methoden zu wahren, ebenso bei 155 festgelegt wurde. Im nächsten Schritt wurden mittels der Befehle „Analysis“, „Object Analysis“, „Analyze“ die verschiedenen Bereiche erfasst und in eine Tabelle übertragen. Der dabei durch das Programm ImageTool (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) aus den 20 Tubuli für jeden Hund berechnete mittlere Grauwert wurde in eine Exeltabelle übertragen und für jede Gruppe aus den jeweiligen Einzelwerten der arithmetrische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) sowie die Standardabweichung (SD) berechnet.

#### 3.4.3.3 Deskriptive Auswertung

Für die deskriptive Auswertung wurden die immunhistologisch gefärbten Schnitte aller Hunde, die eine vollständige Spermatogenese aufwiesen, lichtmikroskopisch analysiert. Dabei wurden die Gewebeschnitte dieser Hunde mäanderförmig von rechts nach links und von oben nach unten durchmustert und jeweils 50 Tubuli ausgewertet, die eine annähernd runde Form mit einem deutlichen Lumen aufwiesen. Diese Tubuli wurden, wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben, in die einzelnen Stadien (I-VIII) der Spermatogenese eingeteilt und nach der Lokalisation und der Intensität des vorhandenen immunhistologischen Signals beurteilt. Die Farbintensität wurde mit einer Skala von 0-3 (0= gar nicht gefärbt, 3= stark gefärbt) beurteilt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Schnitte im Zeitraum von 4 Tagen ausgewertet und die Einstellungen in dieser Zeit nicht verändert.

#### 3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

##### 3.5.1 Isolierung von RNA aus Hodengewebe

Die in Alufolie verpackten, in RNA later fixierten und bei -80°C tiefgefrorenen Hodengewebestücke wurden im ersten Schritt mittels eines Hammers grob vorzerkleinert und im Anschluss in einem sterilen, auf -20°C vorgekühlten, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser mit einem Pistill zerpulvert. Ca. 0,1 g Gewebepulver wurden in ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 1 ml Trizol-Reagent (Ambion® Life Technologies GmbH Darmstadt, D) versetzt und mit dem UltraTurrax® homogenisiert. Das Gemisch wurde für 10 Minuten auf Eis verbracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 200 µl auf -20°C gekühltes Chloroform (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) hinzugefügt, das Ganze kurz geschüttelt und wiederum für 5 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Im Anschluss wurde die Probe in eine Zentrifuge verbracht und bei 14000 UpM und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Von den drei entstandenen Phasen wurde die oberste, farblose wässrige Phase, welche die RNA enthielt, abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt. Da RNA sehr instabil ist, wurde diese sofort weiterverarbeitet und aufgereinigt, indem sie erneut wie bereits weiter oben beschrieben, mit Chloroform versetzt und zentrifugiert wurde. Nun wurde der Überstand im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Isopropanol vermischt und dann für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gemisch erneut für 10 Minuten bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet weiterverarbeitet. Dieses RNA-Pellet wurde mit 500 µl, -20°C kaltem, 70%igem Ethanol versetzt und nach einer Ruhephase von 10 Minuten auf Eis, bei 14000 UpM und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift wiederholt. Anschließend wurde das Pellet für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank getrocknet und dann mit 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. versetzt, gevortext und für 10 Minuten bei 70°C im Wasserbad gelöst. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde 1 U/µl RNase-Inhibitor hinzugegeben.

#### 3.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte mittels eines UV-Photometers (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Hierfür wurde vor Beginn der Messung das Gerät auf RNA eingestellt und mittels autoklaviertem Aqua bidest. der Leerwert bestimmt. Für die Messung wurden 2 µl der RNA-Stammlösung mit 98µl autoklaviertem Aqua bidest vermischt und die Extinktion bei 260 nm in Kunststoff-Einmalküvetten bestimmt. Aus der gemessenen Extinktion und der angegebenen Verdünnung berechnete das Photometer unter Anwendung des Extinktionskoeffizienten für RNA (40µg/ml entspricht der Extinktion „1“) die Konzentration der RNA-Stammlösung in ng/µl.

Anhand der gemessenen Konzentration wurden Arbeitsverdünnungen in einer Konzentration von 200 ng/µl hergestellt und wie auch die Stammlösungen bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### 3.5.3 DNase-Behandlung

Zu Beginn jeder Reversen Transkription wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt (Tabelle 4), um falsch positive Ergebnisse durch DNA-Kontaminationen zu verhindern. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte fanden auf Eis statt und wurden unter besonderer Rücksicht auf Sauberkeit zur Vermeidung von Kontaminationen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde ein DNase-Mix hergestellt. Dieser setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Tabelle 4: DNase-Mix pro Einfachansatz

Komponenten	Volumen	Konzentration Stammlösung
MnCl <sub>2</sub>	1 µl	10 mM
PCR-Puffer	1 µl	10 x
DNase I, RNase frei	1 µl	10 U/µl
RNase Inhibitor	0,25 µl	40 U/µl

Von diesem DNase-Mix wurden jeweils 3,25 µl mit 6,65 µl RNA-Arbeitsverdünnung vermischt. Um Kontaminationen der Komponenten des DNase-Mixes ausschließen

zu können, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt („no template control“ NTC). Diese enthielt anstelle der RNA-Arbeitsverdünnung die gleiche Menge an autoklaviertem Aqua bidest. Nachdem alle Proben gut gemischt und kurz anzentrifugiert waren, wurden diese in einem T Personal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D) platziert und die DNase-Behandlung unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

10 Minuten bei 37°C (DNase-Verdau)

5 Minuten bei 75°C (Inaktivierung der DNase)

abkühlen auf 4°C

Die RNA musste nach dieser DNase Behandlung innerhalb kürzester Zeit weiter verarbeitet werden, da die Stabilität der RNA nur für kurze Zeit bei diesen Bedingungen gewährleistet ist.

#### 3.5.4 Reverse Transkription

Da bei der Amplifikation von DNA durch die PCR spezifische DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet werden, wurde die vorbehandelte RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde zunächst ein RT-Mix hergestellt (Tabelle 5), der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Tabelle 5: RT-Mix pro Einfach- bzw. 6-fach-Ansatz

Komponenten	Volumen Einfach- bzw. 6-fach-Ansatz	Konzentration Stammlösung
MgCl <sub>2</sub>	2 µl x 6 = 12 µl	25 mM
PCR-Puffer	1 µl x 6 = 6 µl	10 x
dNTP	4 µl x 6 = 24 µl	10 mM
Random Hexamers	0,5 µl x 6 = 3 µl	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5 µl x 6 = 3 µl	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl x 6 = 3 µl	50 U/µl

Im Anschluss wurden pro Ansatz jeweils 51 µl RT-Mix in ein 0,6 ml Reaktionsgefäß gegeben und 9 µl der DNase-behandelten RNA hinzugegeben. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis statt. Nach kurzer Mischung und Zentrifugation der Proben wurde die

Reverse Transkription im T Personal Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

8 Minuten bei 21°C (Hybridisierung der Random Hexamers)

15 Minuten bei 42°C (Reverse Transkription)

5 Minuten bei 99°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase)

5 Minuten bei 5°C

abkühlen auf 4°C

Die nach diesem Verfahren entstandene, stabile cDNA wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.5.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um in diesem Schritt die Transkription bestimmter Gene nachzuweisen, wurde zunächst ein Prä-Mix (Tabelle 6) bestehend aus folgenden Komponenten hergestellt:

Tabelle 6: Zusammensetzung Prä-Mix für RT-PCR

Komponenten	Volumen	Konzentration Stammlösung
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	25 mM
10 x PCR-Puffer	4 µl	10 x
Aqua bidest.	32,75 µl	

Um die gewünschten Abschnitte der Gene amplifizieren zu können, erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe des Primer-Mixes (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung Primer-Mix für RT-PCR

Komponenten	Volumen	Konzentration Stammlösung
Vorwärtsprimer	0,5 µl	10 pmol/µl
Rückwärtsprimer	0,5 µl	10 pmol/µl
AmpliTaq GOLD™	0,25 µl	5 U/µl

Die verwendeten sequenzspezifischen Primerpaare (Tabelle 8) wurden mit Hilfe des Programms Oligo-Explorer ausgewählt. Hierfür wurden zunächst entweder bereits

veröffentlichte Gensequenzen der gewünschten Spezies *canis lupus familiaris* aus der Gendatenbank kopiert oder über den Vergleich des kompletten Genoms der zu untersuchenden Spezies mit dem Genom einer Spezies, bei welcher das kodierende Gen bereits bekannt ist, ein Abschnitt auf dem Genom ermittelt, welcher eine möglichst hohe Übereinstimmung der einzelnen Basenpaare aufwies. Diese Sequenzen wurden in das Programm Oligo Explorer kopiert und möglichst optimale Primer ausgewählt. Im nächsten Schritt wurde ein erneuter Sequenzvergleich mit dem Programm BioEdit an der Gensequenz der zu untersuchenden Spezies durchgeführt, um die Übereinstimmung der erzeugten Primer mit dem Gen zu überprüfen. Alle Primer wurden zusätzlich mittels des Online-Programms „BLAST“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) an den jeweils aktuellen Hundegenomdaten überprüft, um die Bindung an weitere Gene zu vermeiden. Die ausgewählten Primerpaare wurden von der Firma Eurogenetec S.A. (Seraing, Belgium) hergestellt.



Tabelle 8: Verwendete hundespezifische Primersequenzen

Zielgen	Basensequenz (5'-3') (for = Forward Primer, rev = Reverse Primer)	Produktgröße	T <sub>A</sub>	Effizienz	Accession Nr.
Cx43	for CCA-TCT-CTA-ACT-CCC-ATG-CAC-AGC rev TGG-CAC-GAC-TGC-TGG-CTC-TGC-T	137 bp	60°C	1,93	NM_001002951
OCLN	for TCC-TGC-TGC-TCC-TGA-AGA-TC rev TGT-CCC-CAC-CGT-ACA-CAT-C	138 bp	60°C	1,96	NM_001003195
CLDN-3	for CAT-CGG-CAG-CAG-CAT-CA rev GCA-CCA-CGC-AGT-TCA-TCC	65 bp	60°C	1,87	NM_001003088
CLDN-5	for GTG-ACC-GCC-TTC-CTG rev GCA-CGA-CAT-CCA-CAG-CC	69 bp	60°C	2,01	NM_001130861.1
CLDN-11	for CCA-CGG-GGC-TGT-ACC-ACT rev CGA-GGC-TGC-GAT-CAT-CAG	71 bp	60°C	1,86	XM_003434149
GAPDH	for GGC-CAA-GAG-GGT-CAT-CAT-CTC rev GGG-GCC-GTC-CAC-GGT-CTT-CT	228 bp	60°C	1,83	NM_001003142.1

Als Negativkontrolle diente die im Abschnitt 3.5.3 beschriebene NTC.

Im nächsten Schritt wurde zu je 40 µl des vorbereiteten Primer-Mixes 10 µl cDNA pipettiert, das Ganze vermischt und kurz anzentrifugiert. Dann wurden alle Tubes in den T Personal Thermocycler verbracht und folgendes Programm gestartet:

10 Minuten bei 95°C (Aktivierung der AmpliTaq GOLD™, initiale Denaturierung)

1 Minute bei 94°C (Denaturierung)

2 Minuten bei 60°C (Annealing)

1,30 Minuten bei 72°C (Elongation)

} 39 Wiederholungen

5 Minuten bei 72°C (finale Elongation)

abkühlen auf 4°C

#### 3.5.6 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten

Zur Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte eine horizontale Gelelektrophorese in einem 2%-igem Agarosegel. Hierfür wurden 1,82 g Agarose in 91 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) in einer haushaltsüblichen Mikrowelle bei 560 Watt mehrmals kurz aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach kurzer Abkühlung wurden der Agaroselösung 9,1 µl GelGreen™ (Biotium, Inc. Hayward, CA, USA) zugefügt. Nach mehrmaligem Schwenken wurde das flüssige Gel in die Gießvorrichtung der horizontalen Gelelektrophoresekammer EasyPhor Medi (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D) gegossen. Zur Bildung der Probenaschen wurde eine 20-zahnige Kammschablone in das noch flüssige Gel eingesetzt und dieses bis zum Erstarren bei Raumtemperatur ausgekühlt. Im nächsten Schritt wurde die Kammschablone entfernt und das 15,0 x 10,0 x 0,5 cm große Gel mit dem Gelträger in die Elektrophoresekammer übertragen. Anschließend wurde die Kammer bis 0,5 cm oberhalb der Gelgrenze mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt. Für die Elektrophorese wurden je 15 µl des PCR-Produktes mit 1,5 µl Ladepuffer vermischt und vorsichtig in die Probenaschen pipettiert. Zur späteren Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Ladder mitgeführt. Dafür wurde 1 µl des DNA-Ladders mit 1,5 µl Ladepuffer und 7 µl autoklaviertem Aqua bidest. gemischt und ebenfalls in die Probenaschen pipettiert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei einer konstanten Spannung von 125 V und einer maximalen Stromstärke von 300 mA über eine Dauer von 45 Minuten. Mit Hilfe von UV-Licht (312 nm) im Transilluminator

konnte das an die PCR-Produkte gebundene, fluoreszierende GelGreen™ sichtbar gemacht werden und über die integrierte Kamera auf den Pentium PC übertragen werden. Mittels der Software „Phoretix Grabber“ wurden die Belichtung und der Kontrast optimiert und ein digitalphotographisches Bild festgehalten.

#### 3.5.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Spezifität der durch die PCR erhaltenen PCR-Produkte zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung durch die Firma SRD-Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, D durchgeführt. Für die dafür benötigte Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das QIA-quick® PCR-Purification Kit 50 (QIAGEN GmbH Deutschland, Hilden, D) verwendet. Dabei wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen.

Vor Beginn der eigentlichen Aufreinigung wurde der im Kit vorhandene PE-Puffer im Verhältnis 1:250 mit dem pH-Indikator vermischt. Davon wurden wiederum 250 µl zu 50 µl PCR-Produkt pipettiert. Nachdem eine im Kit vorhandene QIAquick spin column in ein 2 ml Sammel-Tube eingebracht wurde, wurden die im vorhergehenden Schritt vorbereiteten 300 µl in die QIAquick spin Säule pipettiert. Diese wurde dann in eine Zentrifuge verbracht und für 60 Sekunden bei 13000 UpM zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und im nächsten Schritt 750 µl reiner PE-Puffer in die QIAquick spin Säule pipettiert und dies wiederum für 60 Sekunden bei 13000 UpM zentrifugiert. Wieder wurde der abzentrifugierte Puffer verworfen und um eine vollständige Entfernung der Puffer-Rückstände zu gewährleisten, wurde die QIAquick spin Säule im Sammel-Tube ohne erneute Pufferzugabe ein weiteres Mal zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit verworfen. Dann wurde die QIAquick spin Säule in ein Mikrozentrifuge-Tube überführt und 30 µl des EB-Puffers in das Zentrum der QIAquick-Membran pipettiert. Nachdem eine Inkubation von 1 Minute beendet war, wurde alles wiederum für 60 Sekunden bei 13000 UpM zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde nun bis zur Sequenzierung durch die Firma SRD-Scientific Research and Development GmbH Bad Homburg bei -20°C gelagert.

#### 3.6 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (Real time RT-PCR oder qPCR)

##### 3.6.1 Vorbereitung der Proben

Für die Durchführung der qPCR wurden die Gewebeproben, wie in den oben beschriebenen Abschnitten 3.5.2 – 3.5.4 beschrieben, vorbereitet.

##### 3.6.2 Primer-Herstellung

Für die qPCR wurden dieselben Primer verwendet wie in der konventionellen PCR.

##### 3.6.3 Prinzip der SYBR Green qPCR

Die quantitative qPCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Diese Quantifizierung wird über die Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen ermöglicht, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zunimmt. Die Quantifizierung wird anhand des Fluoreszenzsignals des gebundenen DNA-Farbstoffs SYBR Green in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. SYBR Green interkaliert in die cDNA, wodurch der Anstieg der Fluoreszenz mit der Zunahme der Target-DNA von Zyklus zu Zyklus korreliert. Die bei diesem Verfahren durch die unspezifische Bindung des Farbstoffs an die DNA resultierende geringe Spezifität kann durch die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse der DNA ausgeglichen werden. Hierbei wird durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung die DNA aufgeschmolzen. Dabei kommt es bei einer für das Fragment spezifischen Temperatur zur Denaturierung des Doppelstrangs, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine gleichzeitige Fluoreszenzabnahme registriert wird.

In der hier durchgeführten qPCR wurde eine relative Quantifizierung bezogen auf GAPDH als Referenzgen/House Keeper durchgeführt. Dieses Gen wird innerhalb des Zellzyklus nicht reguliert und kann somit zur Normalisierung des Zielgens eingesetzt werden.

#### 3.6.4 Etablierung der Standardkurve und Ermittlung der Effizienz der qPCR

Für jedes Primerpaar wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eine Standardkurve erstellt. Auf Grundlage dieser konnte dann die Effizienz der verschiedenen Primerpaare für die qPCR berechnet werden. Alle im Folgenden beschriebenen Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt und der Arbeitsplatz zuvor entsprechend gereinigt (siehe Abschnitt 3.5). Für die Verdünnungsreihe wurde eine repräsentative Mischprobe (cDNA-Pool) erstellt, die sich aus allen zu untersuchenden cDNA-Proben zusammensetzte und diese in 10er Stufen nach folgendem Schema mit autoklaviertem Wasser verdünnt:

- 1. Stufe: unverdünnt      ➔ 100 % cDNA-Pool
- 2. Stufe: 1:10            ➔ 10 % cDNA-Pool
- 3. Stufe: 1:100          ➔ 1 % cDNA-Pool
- 4. Stufe: 1:1000        ➔ 0,1 % cDNA-Pool
- 5. Stufe: 1:10000       ➔ 0,01% cDNA-Pool

Diese Verdünnungsstufen wurden im Dreifachansatz pipettiert. Die Herstellung eines qPCR-Mixes (Tabelle 9) erfolgte für die Gesamtzahl der Proben nach folgendem Schema:

Tabelle 9: qPCR-Mix pro Ansatz/Well

Komponente	Konzentration	Volumen
SYBRGreen		10 µl
Forward Primer	10 pmolar	0,6 µl
Reverse Primer	10 pmolar	0,6 µl
Autoklav. Aqua bidest.		7,8 µl

Pro Ansatz wurde zuerst 1 µl der vorbereiteten cDNA in das entsprechende Well der Thermo-Fast 96 skirted PCR Platte (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pipettiert, danach wurden in jedes Well 19 µl des qPCR-Mixes hinzugefügt. Die gesamte Platte wurde mit einer Microseal® 'B' Film Klebefolie (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) verschlossen und in den C1000™ thermal cycler (CFX96™ Real Time System, BioRad, UK) verbracht, welcher über die Software CFX-Manager™ gesteuert wurde. Mit dieser Software konnten die Plattenbelegung und das folgende Reaktionsprogramm eingestellt werden:

3 Minuten	95°C		
10 Sekunden	95°C (Denaturierung)	}	42 Wiederholungen
1 Minute	60°C (Annealing und Elongation)		
10 Sekunden	95°C		
5 Sekunden	65°C		
	95°C		

Nach der Beendigung der qPCR wurden von der integrierten Software CFX-Manager™ sowohl die C(t) Werte als auch die durchgeführte Schmelzkurvenanalyse angezeigt. Ebenso wurden die Steigung der Standardkurve und die sich daraus ergebende Effizienz in %-Zahlen automatisch berechnet. Dabei wurde der eingesetzte Gehalt an cDNA logarithmiert und gegen den ermittelten C(t) Wert des Ansatzes in einem Koordinatensystem dargestellt. Die sich daraus ergebende Steigung der Geraden (m) wurde in die Formel 2 (Pfaffl, 2001) eingesetzt, um die Effizienz der einzelnen Primer-Paare zu ermitteln:

$$E=10^{(-1/m)} \quad (2)$$

Dabei ergaben sich die in Tabelle 10 aufgeführten Effizienzen der einzelnen Primer-Paare.

Tabelle 10: Effizienzen der Primerpaare

Primer-Paar	Effizienz (E)
Cx 43	1,93
OCLN	1,96
CLDN-3	1,87
CLDN-5	2,01
CLDN-11	1,86
GAPDH	1,83

#### 3.6.5 Durchführung der SYBR Green qPCR

Die Herstellung des qPCR Mixes erfolgte, wie in Tabelle 9 beschrieben, für die Gesamtzahl der Proben auf Eis. Alle Proben wurden im Doppelansatz angesetzt und wie unter Abschnitt 3.6.4 beschrieben pipettiert (1 µl cDNA + 19 µl qPCR-Mixes). Für jede Probe wurde auf der gleichen Platte die Expression des Referenzgens GAPDH bestimmt. Zusätzlich wurde auf jeder Platte pro Primerpaar eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher die cDNA durch autoklaviertes Wasser ersetzt wurde. Nachdem alle Ansätze in die Platte pipettiert waren, wurde diese mit einer Microseal® 'B' Film Klebefolie (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) verschlossen. Im nächsten Schritt wurde die Platte in den C1000™ thermal cycler (CFX96™ Real Time System, BioRad, UK) verbracht und das unter 3.6.4 beschriebene Reaktionsprogramm gestartet.

Nach der Beendigung der qPCR wurden von der Software CFX-Manager™ sowohl die C(t) Werte als auch die durchgeführte Schmelzkurvenanalyse angezeigt.

#### 3.6.6 Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Bedingt durch die ermittelten unterschiedlichen PCR-Effizienzen der einzelnen Primer-Paare wurde für die Auswertung der qPCR-Daten eine effizienz-korrigierte relative Quantifizierung nach Pfaffl (2001) angewendet.

Der Expressionsunterschied „ratio“ einer Probe relativ zu einer Kontrolle (Kalibrator), die sich aus einem cDNA-Mix der adulten Kontrollgruppe zusammensetzte und zu dem nicht regulierten Referenzgen GAPDH normalisiert war, ergab sich auf der Basis der im Abschnitt 3.6.4 berechneten PCR-Effizienzen und der von der Software „CFX Manager™“ berechneten C(t)-Werte aus der Formel 3:

$$\text{Ratio} = \frac{E^{\Delta C(t) \text{ Zielgen}}}{E^{\Delta C(t) \text{ Referenzgen}}} \quad (3)$$

Dabei ergab sich der  $\Delta C(t)$  Wert für jede Probe einzeln berechnet aus der Formel 4:

$$\Delta C(t) = \bar{x}C(t)(\text{Kalibrator}) - \bar{x}C(t)(\text{Probe}) \quad (4)$$

$\bar{x}$  C(t)(Probe) entsprach dabei dem arithmetischen Mittelwert der beiden im Doppelansatz ermittelten Proben. Als Kalibrator wurde ein cDNA-Mix der adulten Kontrollgruppe im Doppelansatz verwendet, der ebenso wie die übrigen Proben für das Zielgen und das Referenzgen pipettiert wurde. Auch für den Kalibrator (adulte Kontrollgruppe) wurde aus den beiden gemessenen Proben der arithmetische Mittelwert ermittelt. Mit dem aus der oberen Formel resultierenden Wert „ratio“ wurde die n-fache Expression eines Genes im Vergleich zum cDNA-Pool der adulten Kontrollgruppe (Kalibrator) ermittelt. Durch die Normalisierung mittels des nicht-regulierten Referenzgens GAPDH kann die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert werden, da sich individuelle Effekte der Proben aufheben (Pfaffl, 2004). Die Beschreibung der qPCR-Experimente in dieser Arbeit richtete sich nach den beschriebenen MIQE-Richtlinien („Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments“) (Bustin et al., 2009).

#### 3.7 Statistische Auswertung

Die Erfassung und Auswertung der Daten sowie die Veranschaulichung der Daten durch die Erstellung von graphischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation, wurden mittels der Software Microsoft® Excel an einem Macbook Pro durchgeführt. Alle statistischen Berechnungen und Analysen wurden von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Dr. K. Failing unter Anwendung der Statistikprogramme BMDP/Dynamic und StatXact durchgeführt.

Waren die gewonnenen Ergebnisse annähernd normalverteilt, wurden zur Beschreibung der Daten der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Zeigten die Variablen eine rechtsschiefe Verteilung positiver quantitativer Merkmale, wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt. Für die Datenbeschreibung und -darstellung wurde dann der geometrische Mittelwert ( $\bar{x}_g$ ) sowie der Streufaktor (SF) ermittelt und unter Zuhilfenahme der Intervalle  $\bar{x}_g \cdot SF$  und  $\bar{x}_g / SF$  graphisch dargestellt. Lagen binominalverteilte Zufallsvariablen zu Grunde, erfolgte zur Annäherung an eine Normalverteilung sowie zur Varianzstabilisierung eine Arcus-Sinus-



Transformation [ $y = \arcsin(\sqrt{x}/100)$ ] mit anschließender Berechnung und Darstellung des modifizierten 1s-Bereich nach arcsin-Transformation.

Für die statistische Untersuchung der einzelnen Versuchsgruppen auf Signifikanzen wurde für die Resultate mit annähernder Normalverteilung bzw. Normalverteilung nach Transformation eine einfaktorielle Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA „analysis of variance“) mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Ergaben sich dabei statistisch signifikante Unterschiede, wurde im Anschluss ein paarweiser Gruppenvergleich (Tukey-Test) durchgeführt. Bei ordinalskalierten Merkmalen wurde um globale Gruppeneinflüsse feststellen zu können, entweder der exakte Kruskal-Wallis Test oder der asymptotische Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Bei signifikanten Ergebnissen im Kruskal-Wallis-Test wurden im Anschluss multiple Vergleiche mit dem Dunn-Test (Programmpaket BiAS) gerechnet. Bei Vorliegen von quantitativen Merkmalen wurde die Untersuchung der Zusammenhänge mit Hilfe von Korrelationsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) durchgeführt.

Die jeweiligen Verfahren wurden stets für alle 3 Kollektive bestehend aus Kollektiv 1: DG A, DG B, DG D und CG; Kollektiv 2: Wochengruppe-0, -3, -6, -9, -12, -24 und CG; Kollektiv 3: Wochengruppe-0, JG, PG, SG und CG, angewendet. Für die statistische Auswertung der stagespezifischen Färbung in der Immunhistochemie wurden die einzelnen Stages bezogen auf ähnliches Färbeverhalten zusammengefasst. Dabei wurden Stage II und III sowie Stage VI und VII zusammengefasst und gemeinsam betrachtet. Alle weiteren Stages wurden jeweils einzeln beurteilt. Bei allen statistischen Untersuchungen wurde als Signifikanzniveau stets  $\alpha=0,05$  gewählt, sodass Resultate mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurden.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Messung der Sertoli-Zellkerngröße

Die Ergebnisse für die Vermessung der Sertoli-Zellkerne sind in Tabelle 11 und Abbildung 7 dargestellt. Bei der statistischen Auswertung ergab sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für den Vergleich zwischen den Gruppen DG A, DG B, DG C, DG D und CG (Kollektiv 1) eine statistische Signifikanz von  $p=0,0304$ . Die Sertoli-Zellkerne der Gruppe DG D waren signifikant größer als die der Gruppen DG A und DG C ( $p<0,05$ ). Zu den Gruppen DG B und CG zeigten sich keine signifikanten Unterschiede dieses Kollektivs. Im Vergleich der Wo0 bis -24 sowie der adulten Kontrollgruppe (Kollektiv 2) konnte ebenso eine statistische Signifikanz (ANOVA  $p=0,0324$ ) nachgewiesen werden. Bei den Hunden der Wo0 und -6 ist die durchschnittliche Zellkerngröße signifikant kleiner als in Wo12 ( $p<0,05$ ). Zu den anderen Wochengruppen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung des 3. Kollektivs (ANOVA  $p=0,0047$ ) bestehend aus den Gruppen SG, PG, Wo0, JG und CG konnte ein signifikanter Unterschied der adulten Kontrollgruppe zu den Hunden der Gruppe PG ( $p<0,01$ ), SG und JG ( $p<0,05$ ) festgestellt werden.

Tabelle 11: Fläche der Sertoli-Zellkerne in  $\mu\text{m}^2$ , Gruppenmittelwerte ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Gruppen	Fläche in $\mu\text{m}^2$ ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )
PG	28,40 $\pm$ 2,15
SG	29,67 $\pm$ 2,18
JG	29,56 $\pm$ 3,09
DG A	33,38 $\pm$ 4,37
DG B	36,51 $\pm$ 7,09
DG C	34,09 $\pm$ 4,13
DG D	42,52 $\pm$ 4,21
CG	37,59 $\pm$ 2,53
Woche 0	32,18 $\pm$ 4,47
Woche 3	34,00 $\pm$ 2,96
Woche 6	32,29 $\pm$ 3,39
Woche 9	37,72 $\pm$ 1,54
Woche 12	44,52 $\pm$ 6,26
Woche 24	38,07 $\pm$ 7,71

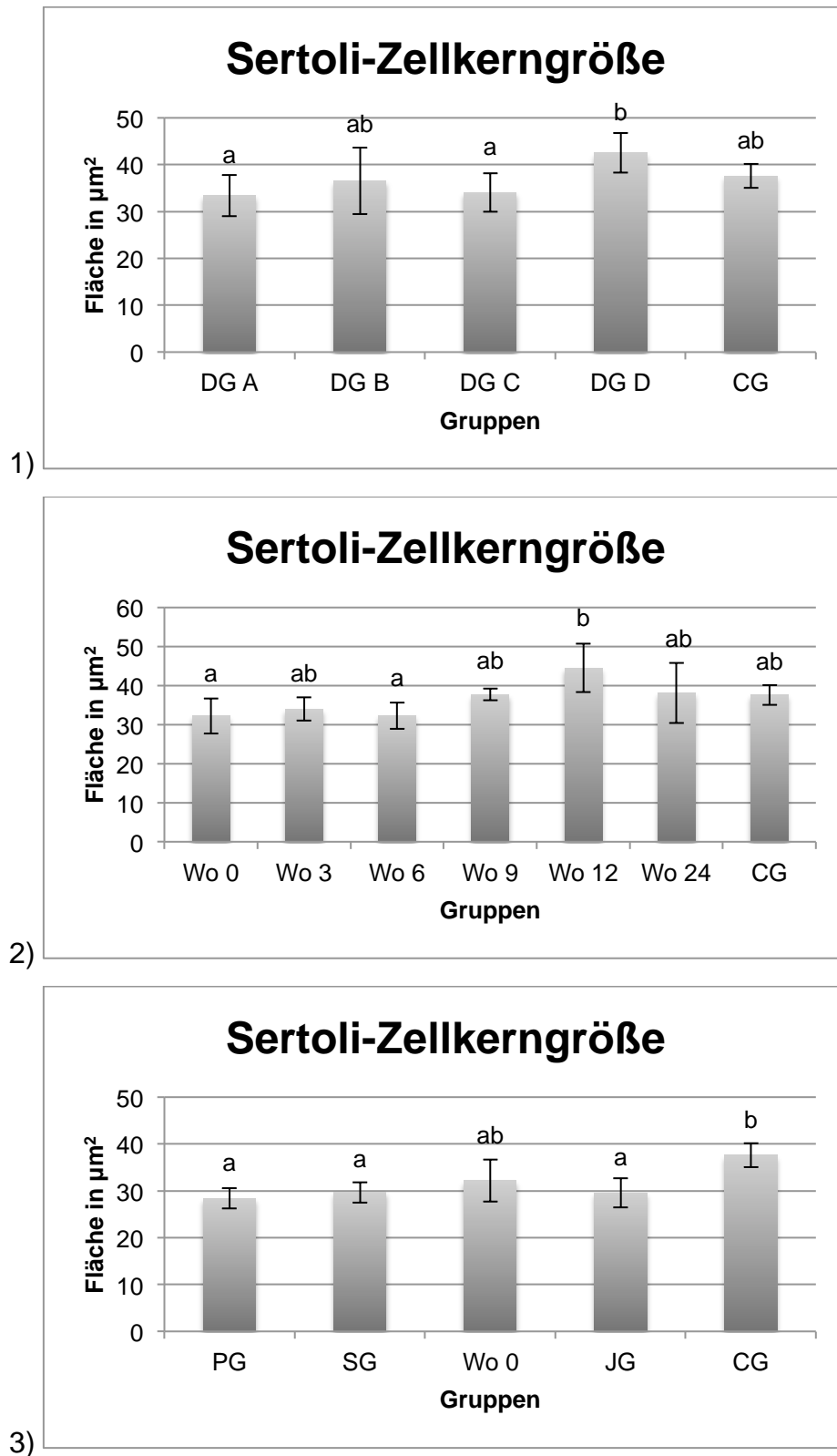


Abb. 7 Fläche der Sertoli-Zellkerne in  $\mu\text{m}^2$ , Gruppenmittelwerte ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), 1) Kollektiv 1, DG A – DG B und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b  $p < 0,05$ .

### 4.1 Expression auf mRNA-Ebene

#### 4.1.1 Ergebnisse der RT-PCR

Der qualitative Nachweis auf mRNA-Ebene erfolgte am Hodengewebe von jeweils einem Vertreter der verschiedenen Gruppen DG A bis DG D sowie der Kontrollgruppen CG, PG und SG. Als Houskeeping Gene Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

Für alle Hodenhomogenatproben ergab sich nach der gelelektrophoretischen Auftrennung für die Expression von GAPDH eine deutliche Bande, die zwischen 200 und 300 bp auf gleicher Höhe lag (jeweils rechtes Bild in Abb. 8 - 12). Diese stimmte mit der zu erwartenden Größe von 228 bp überein und bestätigte damit die Integrität der verwendeten mRNA sowie der daraus gewonnenen cDNA. Zusätzlich wurde bei allen RT-PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, welche keine Bande aufwies.

##### 4.1.1.1 Gap-Junction Protein Connexin43

Die mittels qualitativer RT-PCR und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelten Banden für die Expression von Cx43 lagen bei allen Hodengewebsproben der einzelnen Hunde aus den verschiedenen Gruppen zwischen 75 und 200 bp (Abb. 8). Dies entsprach dem erwarteten Bereich des PCR-Produktes für Cx43 von 137 bp.

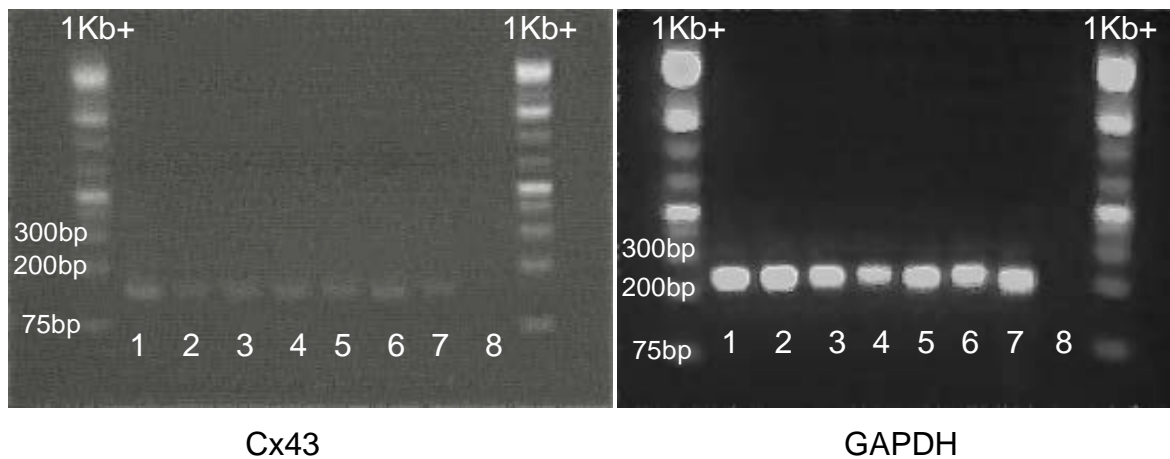


Abb. 8 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Connexin 43 (Cx43) und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A; 2 DG B; 3 DG C; 4 DG D; 5 CG; 6 PG; 7 SG; 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/ Größenstandard.

### 4.1.1.2 Tight-Junction Proteine

#### 4.1.1.2.1 Occludin

Wie die Abb. 9 zeigt ergaben sich nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der durch die qualitative RT-PCR gewonnen Amplifikate für alle Hodengewebeproben einheitliche Banden auf der Höhe zwischen 75 und 200 bp, was dem für das PCR-Produkt von Occludin erwarteten Bereich von 138 bp entsprach.

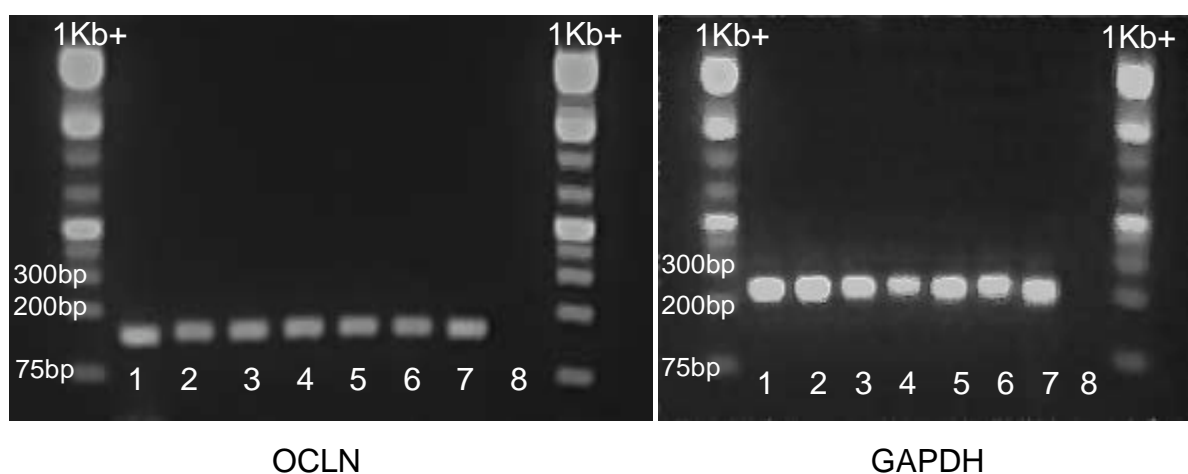


Abb. 9 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Occludin (OCLN) und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A; 2 DG B; 3 DG C; 4 DG D; 5 CG; 6 PG; 7 SG; 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/ Größenstandard.

### 4.1.1.2.2 Claudin-3

Auch die Expression von Claudin-3 war nach der gelelektrophoretischen Auftrennung bei allen Hodengewebeproben deutlich auf der gleichen Höhe zwischen 50 und 100 bp zu erkennen (Abb. 10), was die erwartete Größe des entsprechenden PCR-Produktes von 65bp bestätigte.

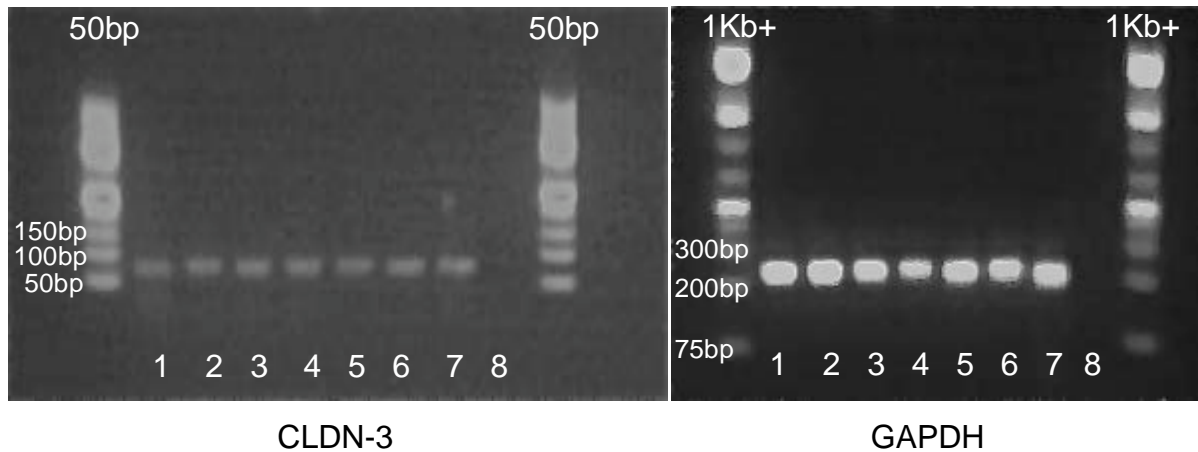


Abb. 10 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Claudin-3 (CLDN-3) und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A; 2 DG B; 3 DG C; 4 DG D; 5 CG; 6 PG; 7 SG; 8 Negativkontrolle; 50 bp: Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder/Größenstandard; 1Kb+: 1kb DNA Ladder Plus/Größenstandard.

### 4.1.1.2.3 Claudin-5

Ebenso zeigte sich bei der Expression des Claudin-5 Amplifikats eine deutliche Bande in allen Gruppen, die wenig unterhalb der 75 bp Bande lag (Abb. 11) und damit ungefähr der zu erwartenden Größe des Claudin-5 PCR-Produktes von 69bp entsprach.

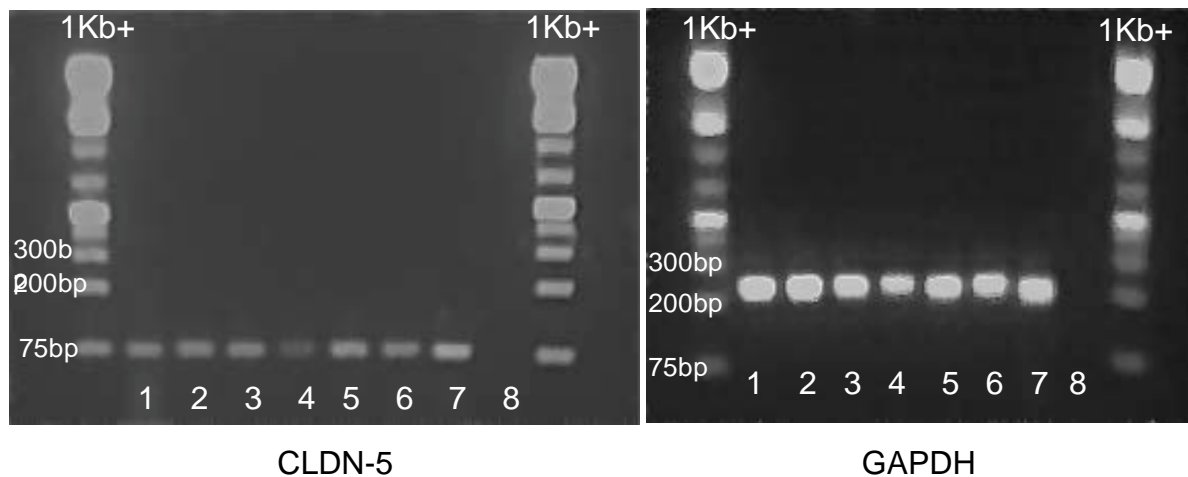


Abb. 11 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Claudin-5 (CLDN-5) und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A; 2 DG B; 3 DG C; 4 DG D; 5 CG; 6 PG; 7 SG; 8 Negativkontrolle; 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/ Größenstandard.

### 4.1.1.2.4 Claudin-11

Des Weiteren konnte auch nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-produkte von Claudin-11 für alle untersuchten Gewebeproben jeweils eine Bande auf der Höhe zwischen 75 bp und 200 bp detektiert werden (Abb. 12), welche der für das Amplifikat erwarteten Größe von 144 bp entsprach.

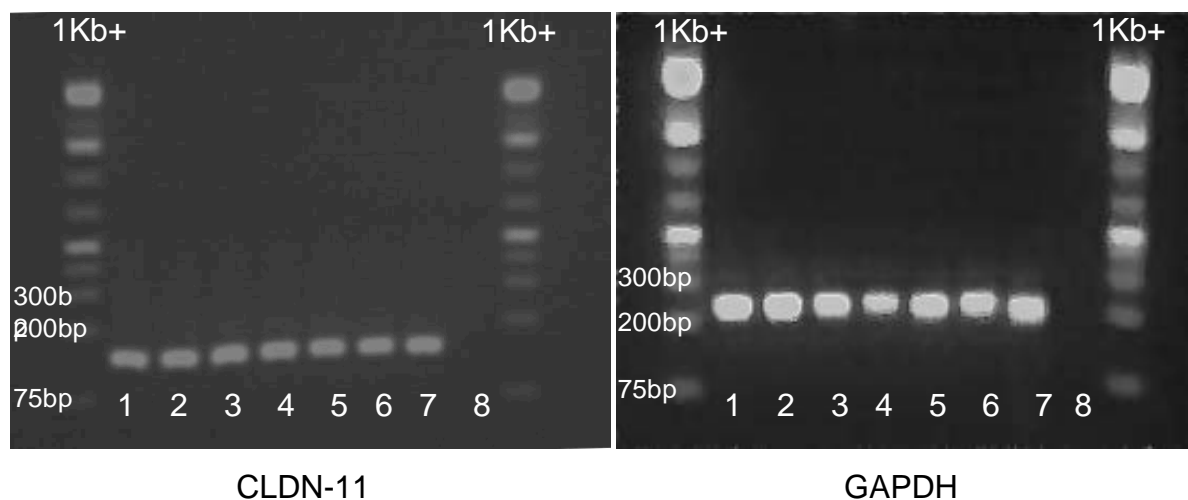


Abb. 12 Gelelektrophoretischer Nachweis der Expression von Claudin-11 (CLDN-11) und GAPDH mittels RT-PCR; 1 DG A; 2 DG B; 3 DG C; 4 DG D; 5 CG; 6 PG; 7 SG; 8 Negativkontrolle; L 1 Kb+: 1 kb DNA Ladder Plus/ Größenstandard.



### 4.1.2 Ergebnisse der qPCR

Der quantitative Nachweis der Genexpression wurde an allen Hunden der einzelnen Gruppen untersucht. In den Tabellen 12 bis 16 und den Abbildungen 13 bis 17 sind die Resultate der qPCR für das Gap-Junction Protein Cx43 sowie die vier Tight-Junction Proteine OCLN, CLDN-3, -5, -11 aufgeführt. Aufgrund der schiefen Verteilung wurden die Ergebnisse der qPCR logarithmisch transformiert und in Folge die Ratio als geometrischer Mittelwert ( $\bar{x}_g$ ) mit dem Streufaktor (SF) angegeben. Die Ratio gibt dabei die Differenz der Expression des untersuchten Gens zum Kalibrator relativ zum eingesetzten Referenzgen (GAPDH) an. Die zur Kontrolle mitgeführten Negativkontrollen zeigten stets kein Signal. Um die Spezifität der qPCR zu erhöhen, wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich in der nach jeder qPCR automatisch durch das Programm durchgeführten Schmelzkurvenanalyse eine Kurve mit lediglich einem Peak bei der für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur.

#### 4.1.2.1 Gap-Junction Protein Cx43

Die im Kollektiv 1 zusammengefassten Gruppen (DG A - D und CG) unterschieden sich nicht voneinander. Im Gegensatz dazu ergab sich bei der Betrachtung der Gruppen in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt (Kollektiv 2: Wo0, -3, -6, -9, -12, -24 und CG) ein signifikanter Unterschied (ANOVA  $p=0,0100$ ), wobei die relative mRNA Expression bei den Tieren der Wo3 signifikant höher war im Vergleich zu Wo12 und -24 ( $p<0,05$ ). Auch im Kollektiv 3 (PG, SG, JG, Wo0 und CG) zeigte sich ein signifikanter Unterschied (ANOVA  $p=0,0001$ ), der durch eine signifikant niedrigere Ratio in JG im Vergleich zu Wo0 ( $p<0,05$ ), PG und SG ( $p<0,01$ ) bedingt war (Tabelle 12, Abb. 13).

Tabelle 12: Ratio der mRNA-Expression von Cx43, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)]

Gruppen	Ratio Cx43 [ $\bar{x}_g$ (SF)]
PG	1,61 (1,26)
SG	1,78 (2,18)
JG	0,21 (1,18)
DG A	0,94 (1,33)
DG B	1,13 (1,26)
DG C	0,99 (1,31)
DG D	1,09 (1,80)
CG	0,88 (1,09)
Woche 0	0,94 (1,41)
Woche 3	1,22 (1,16)
Woche 6	1,02 (1,36)
Woche 9	0,63 (1,20)
Woche 12	0,47 (1,38)
Woche 24	0,49 (1,96)

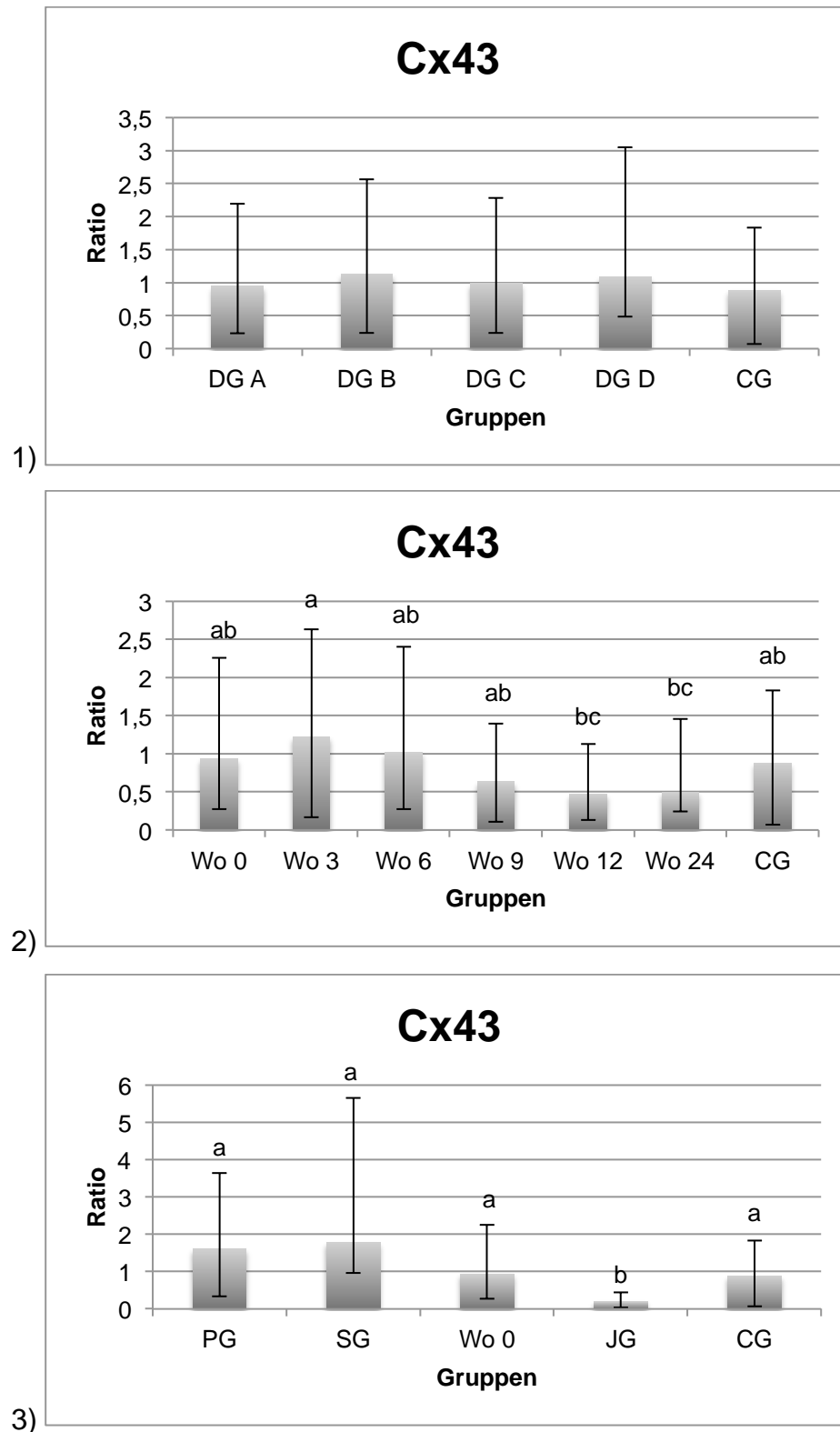


Abb. 13 Ratio der mRNA-Expression von Connexin43, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)], 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b:c p<0,05.

### 4.1.2.2 Tight-Junction Proteine

#### 4.1.2.2.1 Occludin

Die statistische Analyse der ermittelten qPCR Ergebnisse für die verschiedenen Gruppen ergab für OCLN im Kollektiv 1 eine statistische Signifikanz (ANOVA) von  $p=0,0004$ . Dabei zeigte sich, dass die Hunde der Gruppe DG A eine signifikant geringere mRNA-Expression (Ratio) aufwiesen verglichen mit solchen der Gruppen DG D ( $p<0,05$ ), DG C und CG ( $p<0,01$ ). DG D wiederum wies weiterhin eine 6,1fach höhere Expression im Vergleich zu DG B ( $p<0,01$ ) auf. Bei der Betrachtung des Vergleichs der Wochengruppen sowie der adulten Kontrollgruppe CG (ANOVA  $p=0,0077$ ) wies im paarweisen Gruppenvergleich nur die Wo6 eine statistisch signifikant höhere mRNA Expression im Vergleich zu den Wo0 ( $p<0,01$ ) und Wo3 ( $p<0,05$ ) auf. Im Kollektiv 3 (ANOVA  $p=0,0001$ ) zeigte sich wiederum sowohl im Vergleich der juvenilen Hunde mit den Hunden der Gruppen Wo0, PG, SG und CG ( $p<0,01$ ) als auch der adulten Kontrollgruppe zu den Gruppen Wo0 und PG ( $p<0,01$ ) ein signifikanter Unterschied (Tabelle 13, Abb.14)

Tabelle 13: Ratio der mRNA-Expression von Occludin, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)]

Gruppen	Ratio OCLN [ $\bar{x}_g$ (SF)]
PG	0,36 (1,41)
SG	0,56 (1,77)
JG	0,09 (1,25)
DG A	0,31 (1,13)
DG B	0,39 (1,20)
DG C	1,24 (2,45)
DG D	2,38 (2,06)
CG	1,08 (1,12)
Woche 0	0,33 (1,07)
Woche 3	0,40 (1,20)
Woche 6	1,68 (2,26)
Woche 9	1,07 (1,03)
Woche 12	0,94 (2,33)
Woche 24	0,98 (1,47)

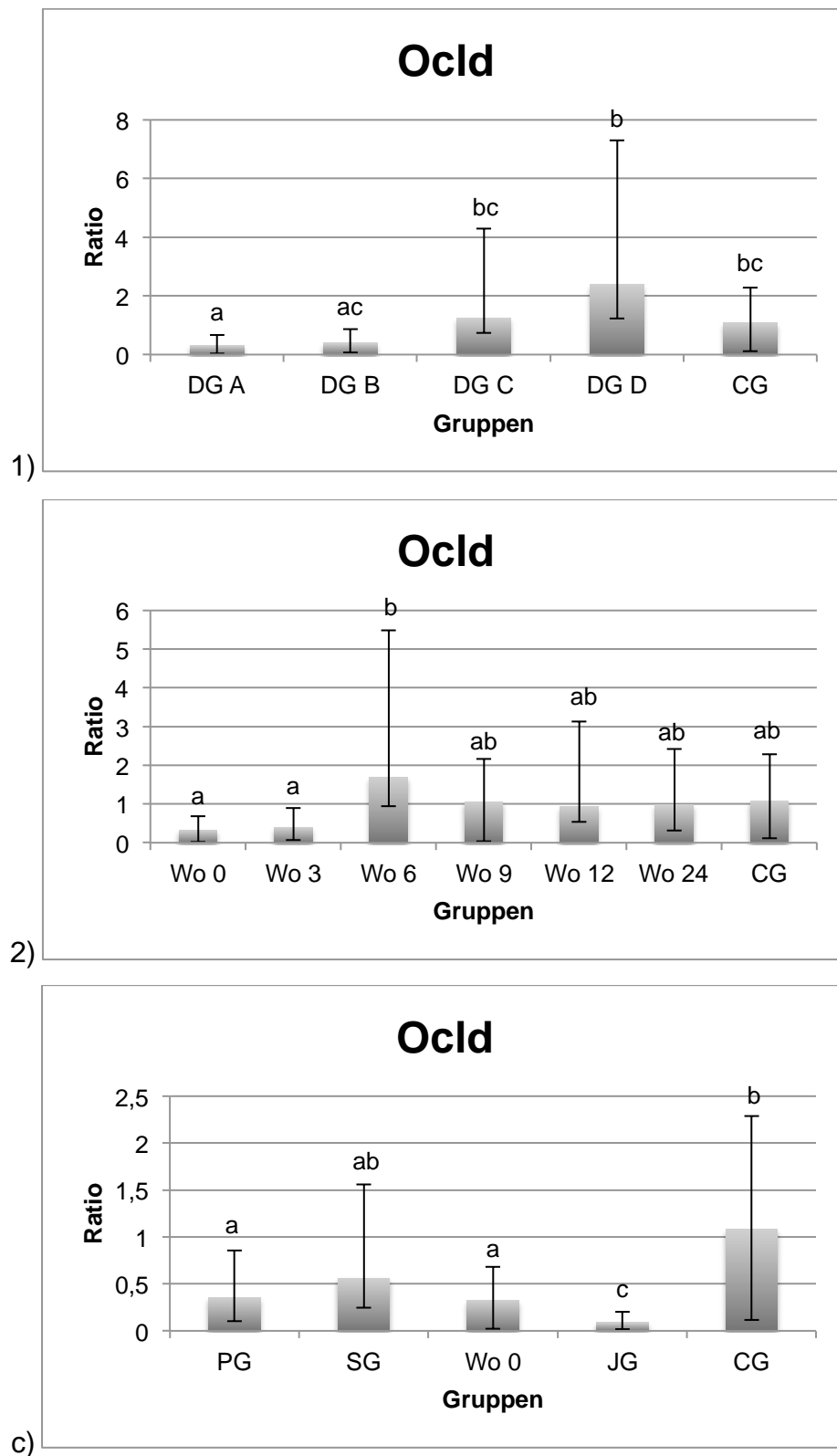


Abb. 14 Ratio der mRNA-Expression von Occludin, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)], 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b:c  $p < 0,05$ .

## 4.1.2.2.2 Claudin-3

Die Resultate der quantitativen qPCR für CLDN-3 sind in Tabelle 14 und Abbildung 20 dargestellt. Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse der Kollektive 1 (DG A-D,CG) und 2 (Wo0-24, CG) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Gruppen Wo0, PG, SG, JG und CG ergab sich ein signifikanter Unterschied (ANOVA  $p=0,0292$ ), wobei die relative Genexpression (Ratio) in SG im Vergleich zur adulten Kontrollgruppe eine 10,5fach ( $p<0,05$ ) und im Vergleich zu den juvenilen Hunde sogar eine 14,9fach ( $p<0,05$ ) höhere war (Tabelle 14, Abb.15)

Tabelle 14: Ratio der mRNA-Expression von Claudin-3, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)]

Gruppen	Ratio CLDN-3 [ $\bar{x}_g$ (SF)]
PG	1,17 (1,76)
SG	4,63 (2,72)
JG	0,31 (1,26)
DG A	1,65 (1,18)
DG B	1,47 (1,04)
DG C	1,11 (1,27)
DG D	2,58 (2,24)
CG	0,44 (4,34)
Woche 0	1,63 (1,22)
Woche 3	1,34 (1,19)
Woche 6	1,15 (1,35)
Woche 9	0,82 (1,17)
Woche 12	0,59 (2,47)
Woche 24	0,49 (1,65)

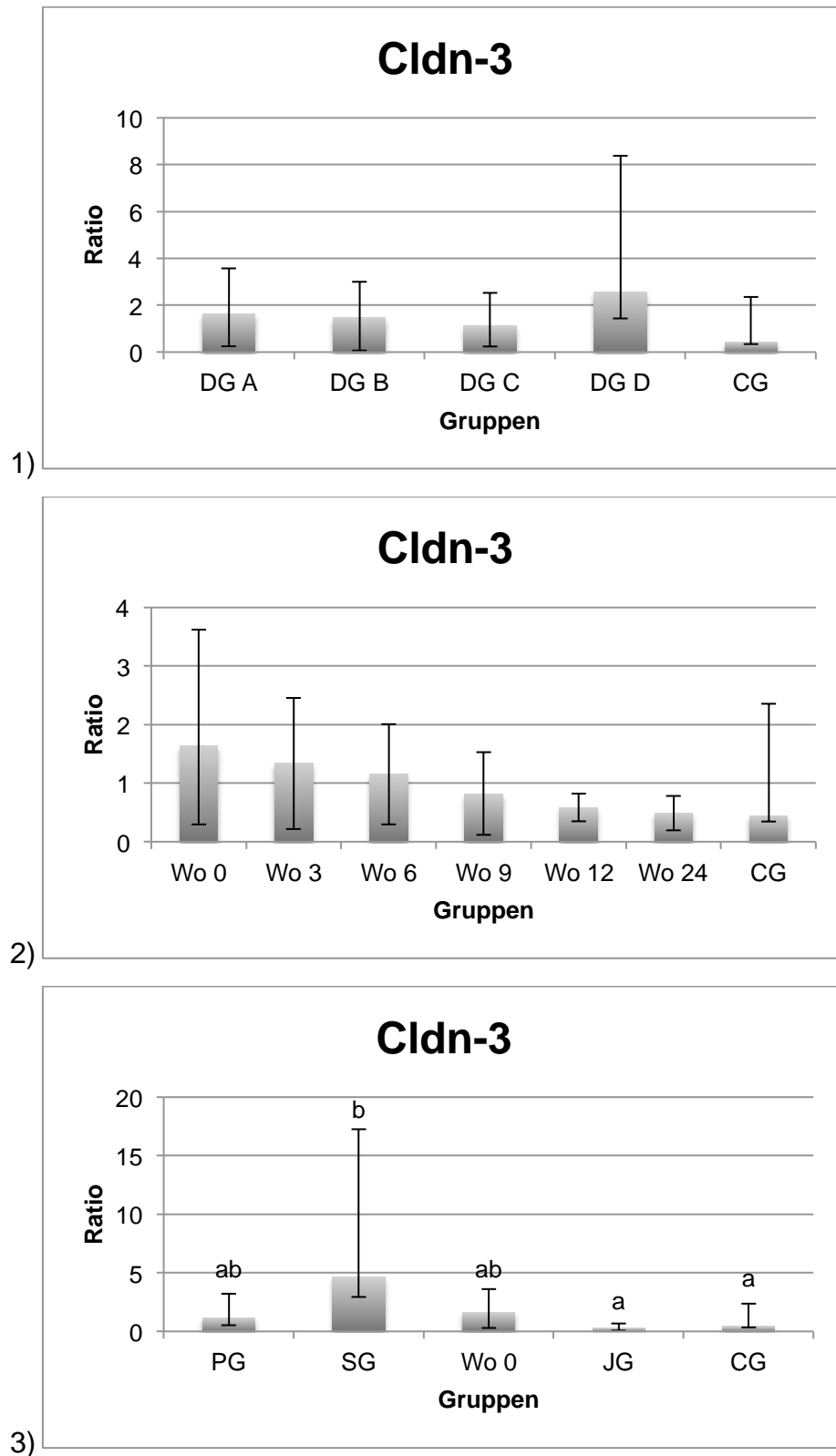


Abb. 15 Ratio der mRNA-Expression von Claudin-3, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)], 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b  $p < 0,05$ .



### 4.1.2.2.3 Claudin-5

Bei der statistischen Auswertung ergab sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse innerhalb aller 3 Kollektive eine statistische Signifikanz (ANOVA) von  $p=0,0001$ . Im angeschlossenen paarweisen Gruppenvergleich zeigte sich innerhalb des Kollektivs 1, dass die Hunde der Gruppe DG A eine 4,22 bis 22fach signifikant höhere Genexpression im Vergleich zu den Gruppen DG B, DG C, DG D und CG ( $p<0,01$ ) aufwiesen. Bei der Betrachtung der Hunde der Gruppe DG B war zudem die relative Genexpression (Ratio) im Vergleich zu den Gruppen DG C und DG D ( $p<0,05$ ) als auch zu der adulten Kontrollgruppe CG ( $p<0,01$ ) signifikant höher. Bei Betrachtung des Kollektivs 2 zeigten die Hunde aus der Wo0 mit Abstand die höchste relative mRNA-Expression für CLDN-5 im Vergleich zu den Gruppen Wo3 ( $p<0,05$ ), -6, -9, -12, -24 und CG ( $p<0,05$ ). Weiterhin konnte innerhalb dieses Kollektivs eine statistische Signifikanz zwischen der Wo3 und den Wo9 ( $p<0,05$ ), -12, -24 und CG ( $p<0,01$ ) festgestellt werden. Bei der Betrachtung des letzten Kollektivs (ANOVA  $p=0,0001$ ) zeigte die adulte Kontrollgruppe eine signifikant bis zu 54fach („Suprelorin“) geringere Genexpression zu allen Gruppen des Kollektivs ( $p<0,01$ ). Ebenso konnte im Vergleich der juvenil kastrierten Hunde ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Gruppen Wo0 ( $p<0,05$ ), PG, SG und adult ( $p<0,01$ ) nachgewiesen werden (Tabelle 15, Abb. 16).

Tabelle 15: Ratio der mRNA-Expression von Claudin-5, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)]

Gruppen	Ratio CLDN-5 [ $\bar{x}_g$ (SF)]
PG	36,83 (1,33)
SG	53,96 (2,67)
JG	5,80 (1,14)
DG A	21,95 (1,68)
DG B	5,20 (1,23)
DG C	1,90 (1,50)
DG D	1,92 (1,88)
CG	1,00 (1,33)
Woche 0	23,23 (1,85)
Woche 3	4,69 (1,46)
Woche 6	1,79 (1,53)
Woche 9	0,92 (1,61)
Woche 12	0,77 (2,13)
Woche 24	0,68 (1,78)

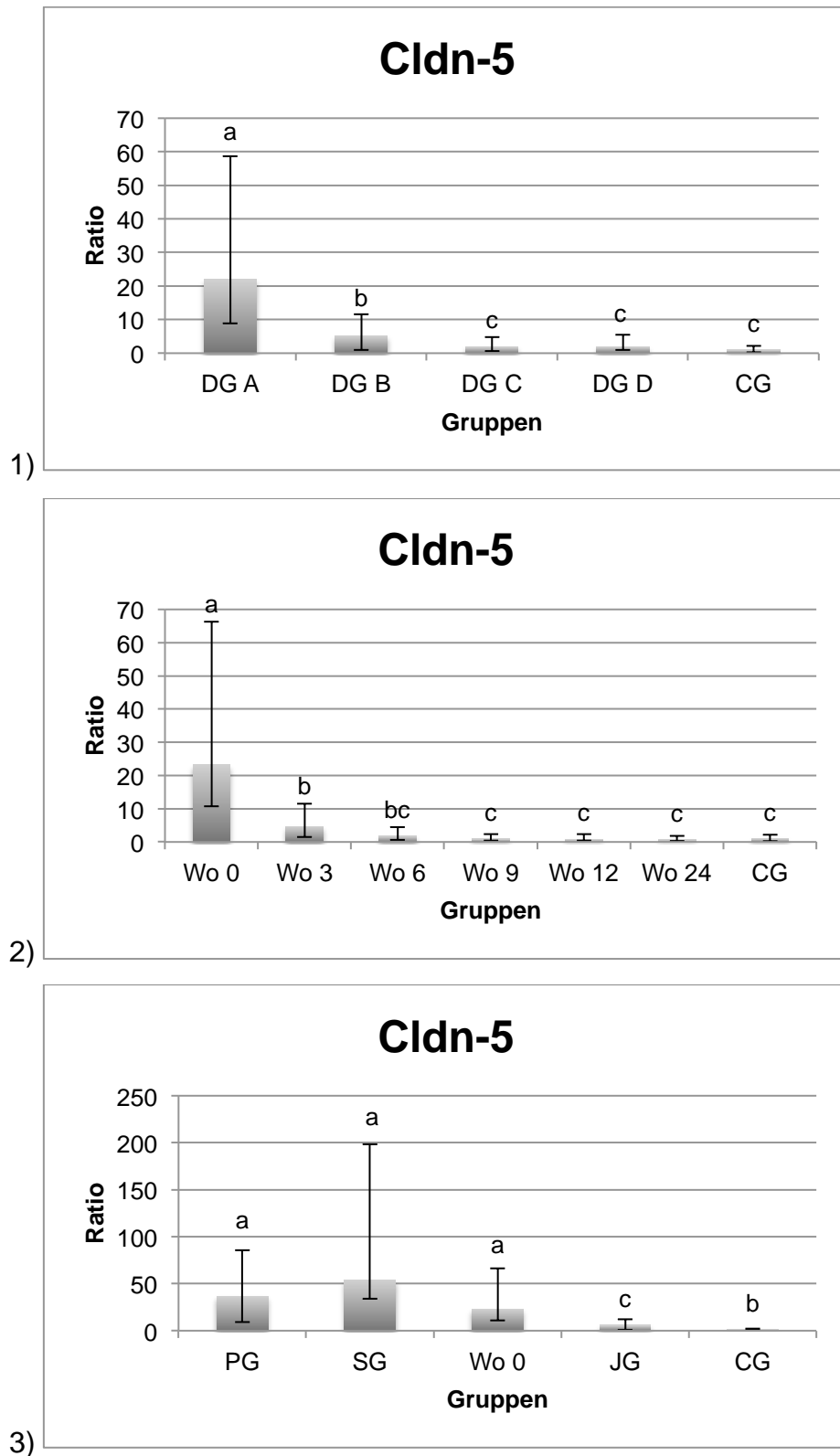


Abb. 16 Ratio der mRNA-Expression von Claudin-5, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)], 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, W0, PG, SG, JG und CG, a:b:c  $p < 0,05$ .

## 4.1.2.2.4 Claudin-11

Tabelle 16 und Abbildung 17 zeigen die Ergebnisse der relativen Genexpression (Ratio) für CLDN-11. Im Vergleich der vier DGs mit der Gruppe CG (Kollektiv 1) ergab sich eine statistische Signifikanz von ANOVA  $p=0,0450$ . Im anschließenden Tukey-Test konnte diese nicht weiter differenziert werden. Beim weiteren Vergleich der einzelnen Wochengruppen untereinander und im Vergleich zu der adulten Kontrollgruppe (Kollektiv 2) konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ANOVA  $p=0,0329$ ). So war die Ratio in Wo3 signifikant höher als in Wo12 ( $p<0,05$ ). In der Gegenüberstellung der Gruppen Wo0, PG, SG, JG und CG (Kollektiv 3, ANOVA  $p=0,0034$ ) zeigte die Gruppe der juvenilen Hunde eine 9,4 bzw. 12,7fach statistische signifikant geringere relative Expression im Vergleich zu Wo0 und PG ( $p<0,01$ ).

Tabelle 16: Ratio der mRNA-Expression von Claudin-11, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)]

Gruppen	Ratio CLDN-11 [ $\bar{x}_g$ (SF)]
PG	3,93 (1,66)
SG	1,34 (2,02)
JG	0,31 (1,39)
DG A	2,97 (2,21)
DG B	2,78 (1,05)
DG C	2,77 (1,65)
DG D	1,31 (1,85)
CG	1,15 (1,78)
Woche 0	2,92 (2,64)
Woche 3	3,33 (1,32)
Woche 6	2,35 (1,71)
Woche 9	1,25 (2,80)
Woche 12	0,45 (1,81)
Woche 24	1,03 (1,48)

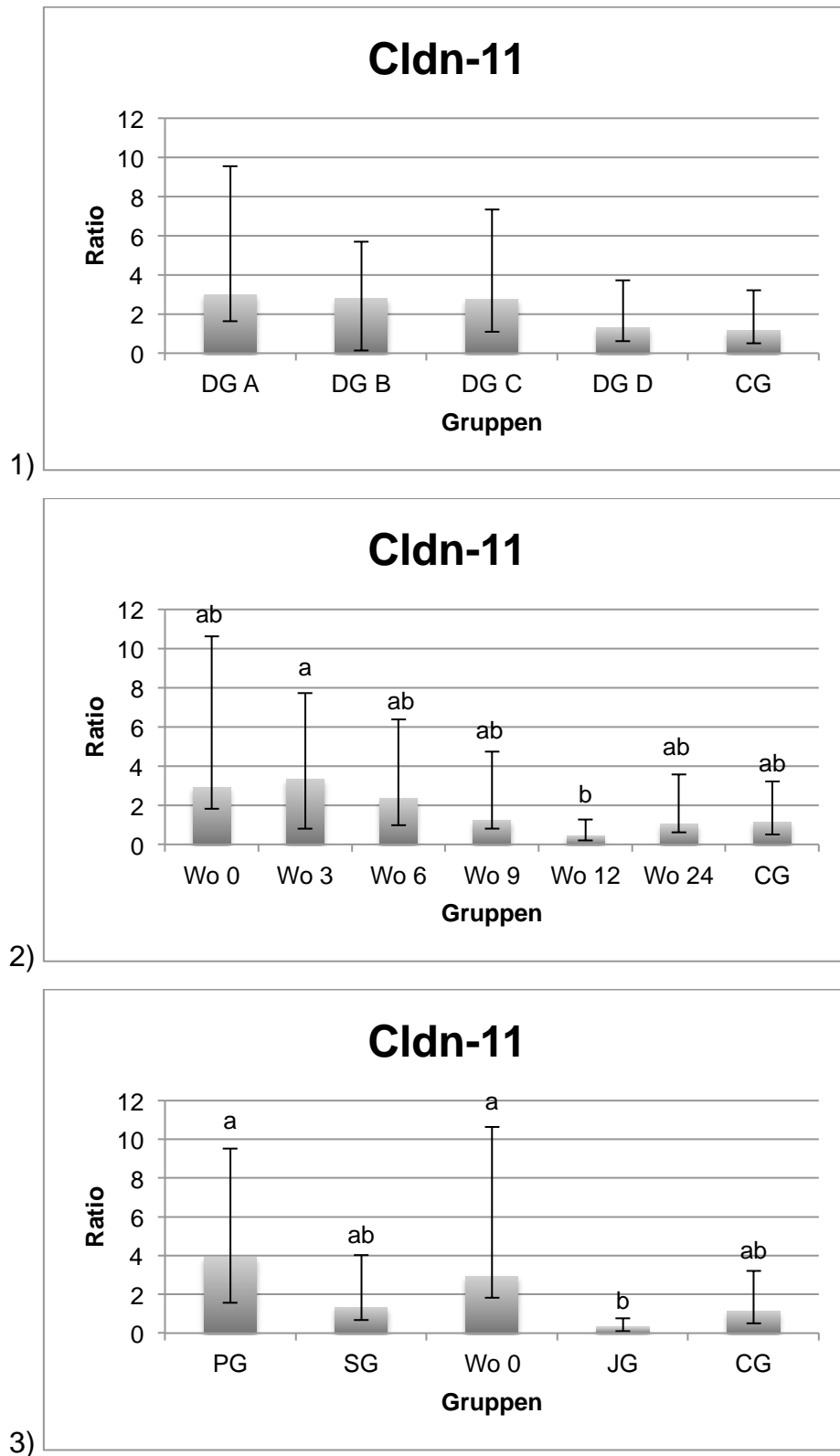


Abb. 17 Ratio der mRNA-Expression von Claudin-5, geometrische Gruppenmittelwerte [ $\bar{x}_g$  (SF)], 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b  $p < 0,05$ .

### 4.1.3 Ergebnisse der Sequenzierung aller verwendeten Primer-Paare

Stellvertretend für alle Hodengewebeproben der verschiedenen Gruppen wurde für jedes untersuchte Primer-Paar (Connexin43, Occludin, Claudin-3, -5 und -11) die mittels QIAquick Purification Kit aufgearbeitete cDNA eines zufällig ausgewählten Hundes in 5´-3´Richtung durch die Firma SRD GmbH sequenziert. Dabei konnte eine hohe Übereinstimmung aller PCR-Produkte mit dem jeweiligen Referenzgen festgestellt werden.

Bei der Sequenzierung in 5´-3´-Richtung der mittels des Cx43-Primers amplifizierten caninen cDNA ergab sich im Vergleich zum entsprechenden Referenzgen (NM\_001002951) eine Homologie von 96%. Diese geringfügigen Abweichungen ergaben sich aus zwei nicht nachweisbaren Basen an den Stellen 43 und 44 sowie durch zwei fälschlicherweise eingebaute Adeninmoleküle an den Stellen 36 und 115. Aufgrund der nur minimal vorhandenen Abweichungen kann die nachgewiesene Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit dennoch als Connexin43 Molekül angesehen werden.

Die Ergebnisse der Sequenzierung des OCLN-Amplifikats ergaben eine Homologie im Vergleich zum Referenzgen (NM\_001003195) von 100%. Dies bestätigt den Nachweis des OCLN-Moleküls im caninen Hoden.

Die PCR-Produkte der verwendeten CLDN-3-Primer wiesen eine 93%ige Übereinstimmung mit dem Referenzgen (NM\_001003088) auf. Diese ergab sich aus zwei nicht nachweisbaren Basen an den Stellen 39 und 53. Trotz der geringfügigen Abweichungen kann die nachgewiesene Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit als CLDN-3 Molekül angesehen werden. Weiterhin ergab die Sequenzierung der CLDN-5 Amplifikate eine Homologie zum Referenzgen (NM\_001130861.1) von 100% und beweist damit den Nachweis des Claudin-5 Moleküls im caninen Hodengewebe. Auch die Sequenzierung in 5´-3´ Richtung der CLDN-11 Amplifikate zeigte eine fehlende Base an der Stelle 95 der Sequenz, welche sich allerdings bei der zusätzlich durchgeführten Sequenzierung in 3´-5´ Richtung als Sequenzierungsfehler herausstellte und damit eine Homologie zum Referenzgen (XM\_003434149) von 100% aufwies, was den Nachweis des CLDN-11 Moleküls im caninen Hodengewebe bestätigt.

### 4.2 Expression von Connexin 43 auf Proteinebene

#### 4.2.1 Western Blot

Die Western Blot-Analyse zum Nachweis der Spezifität des in der Immunhistochemie angewendeten Cx43 Antikörpers #3512 (Cell Signaling Technology, Inc; USA) an der Hodengewebsprobe eines adulten Hundes ergab für Cx43 eine Bande im Bereich von ca. 43kDa (Abb. 18) Die als Positivkontrolle verwendete humane Hodengewebsprobe ergab ebenfalls eine Bande auf dieser Höhe. Die Banden im Bereich von 72kDa und 130kDa waren auch in der Negativkontrolle sichtbar und können daher als unspezifisch angesehen werden.

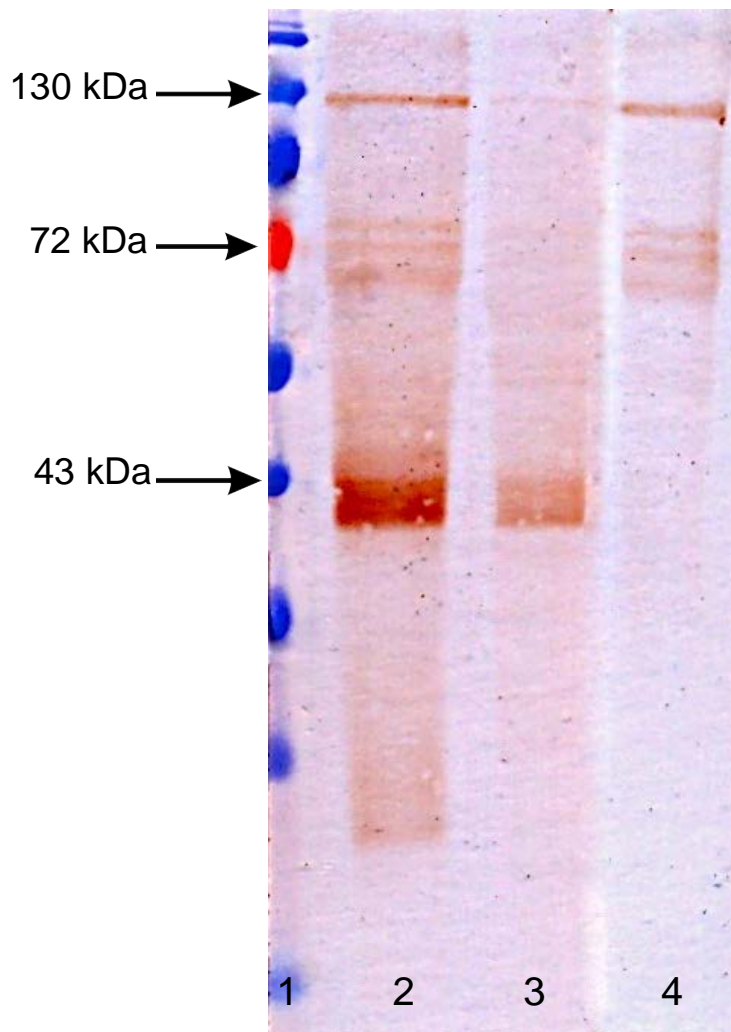


Abb. 18 Western Blot für Connexin43: 1 Protein Ladder 2;3 Positivkontrollen, 4 Negativkontrolle, 2;4 canines Hodengewebe, 3 humanes Hodengewebe.

### 4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen des caninen Hodengewebes zum Nachweis des GJ-Proteins Connexin 43 zeigte sich bei allen Gruppen ein stets somatisches Signal. Alle mit einer Isotypenkontrolle behandelten Negativkontrollen wiesen kein Signal auf. Eine starke Immunreaktion für Cx43 wiesen die interstitiellen Leydig-Zellen auf, sodass dieser Zelltyp als Positivkontrolle im gleichen histologischen Schnitt verwendet werden konnte.

Cx43-Nachweis mittels Cx43 #3512 (Cell Signaling Technology):

Bei den Untersuchungen des Hodengewebes der Hunde aus Wo0 bzw. DG A zeigte sich ein diffuses Signal im Bereich des Sertoli-Zellzytoplasmas im Zentrum des Tubulus. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls in leicht abgeschwächter Form bei den Kontrollgruppen SG und PG gemacht werden. Die einzige Ausnahme innerhalb der DG A Gruppe stellte Elias dar. Hier zeigte sich aufgrund der bereits fortgeschrittenen Ausbildung eines Lumens eine Zentralisation des Signals im adluminalen Bereich, welches aber ebenso auf das Zytoplasma der Sertoli-Zellen beschränkt war. Im Vergleich zu diesen Gruppen zeigte sich bei den Untersuchungen der juvenilen Hunde ein anderes Bild. Diese Hunde wiesen zwar ebenfalls ein diffus verteiltes immunhistochemisches Signal auf, im Vergleich zu den Gruppen Wo0/DG A, PG und SG konnte es jedoch auch basal im Bereich der Keimzellen lokalisiert werden. Im weiteren Verlauf der Rekrudeszenz kam es bei DG B zur Ausbildung eines Lumens innerhalb der Tubuli seminiferi contorti und einer damit verbundenen Konzentration des Signals im adluminalen Bereich. Erst die Hunde aus den Gruppen DG C und DG D, den Wo6, -9, -12 und -24 sowie die Hunde der adulten Kontrollgruppe zeigten eine Lokalisation des Signals im basalen Bereich des Keimepithels. Hier konnte das Signal zwischen benachbarten Sertoli-Zellen als Bestandteil der an dieser Stelle lokalisierten BTB sowie zwischen Sertoli-Zellen und basal gelegenen Keimzellen detektiert werden. Bei genauerer Betrachtung stellten sich die Signale als durchgehende Linie zwischen Spermatogonien und Spermatozyten dar. Bei Tubuli mit luminal vorhandenen elongierten Spermatiden ließ sich weiterhin ein adluminales Signal detektieren. Die folgenden Abbildungen 19A bis 19J zeigen jeweils einen Vertreter der jeweiligen Wochengruppen / developmental groups.



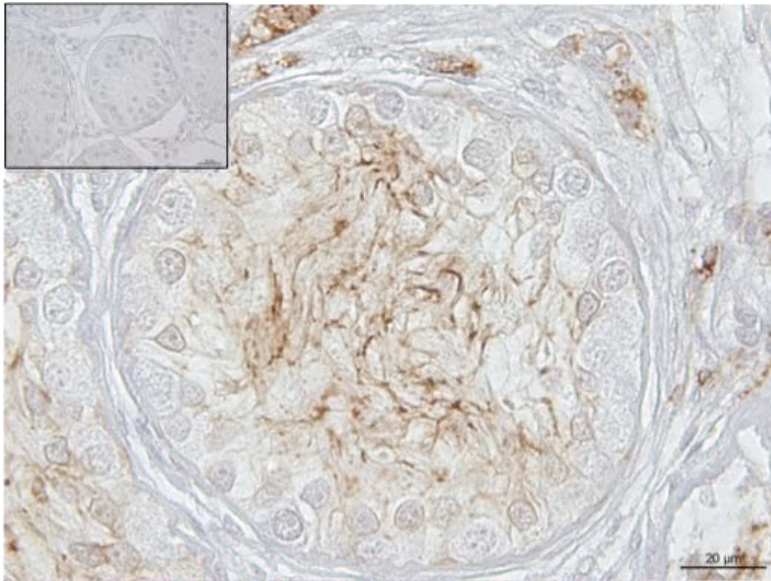


Abb. 19 A  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Percy  
Gruppe: Woche 0 / DG A  
Vergrößerung: 400fach

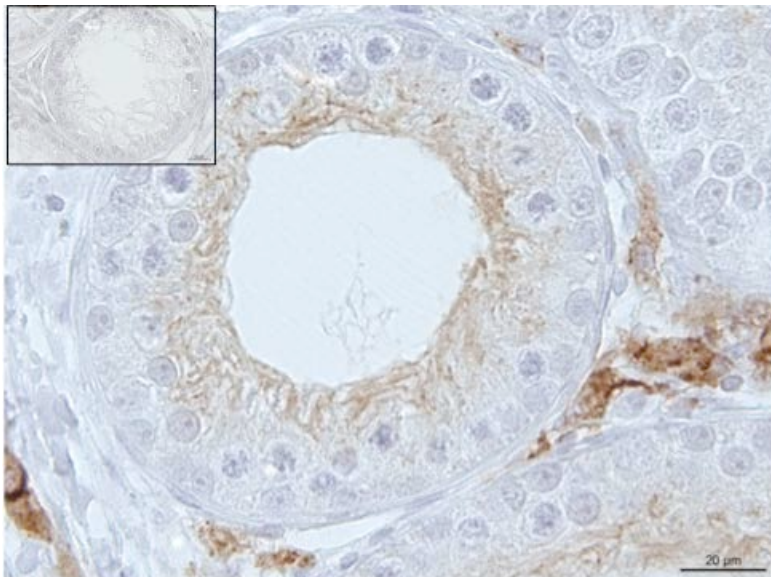


Abb. 19 B  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Theo Hoffmann  
Gruppe: Woche 3 / DG B  
Vergrößerung: 400fach

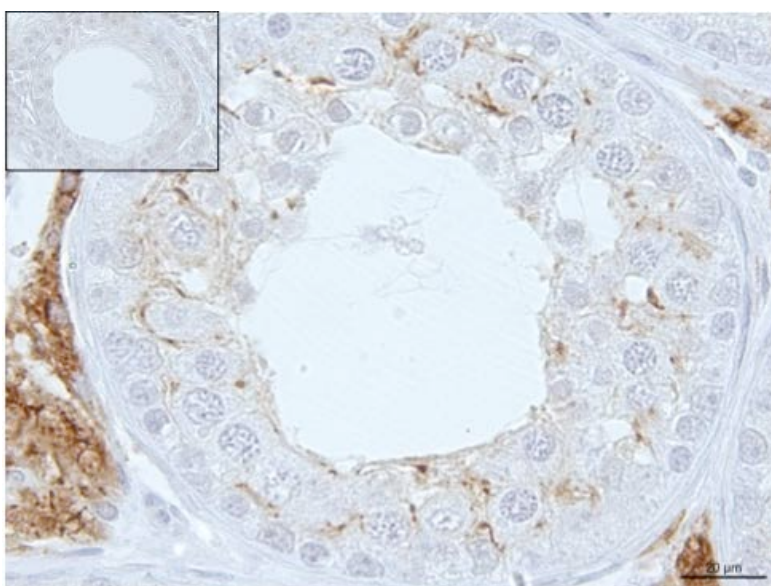


Abb. 19 C  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Snoopy  
Gruppe: Woche 6 / DG C  
Vergrößerung: 400fach



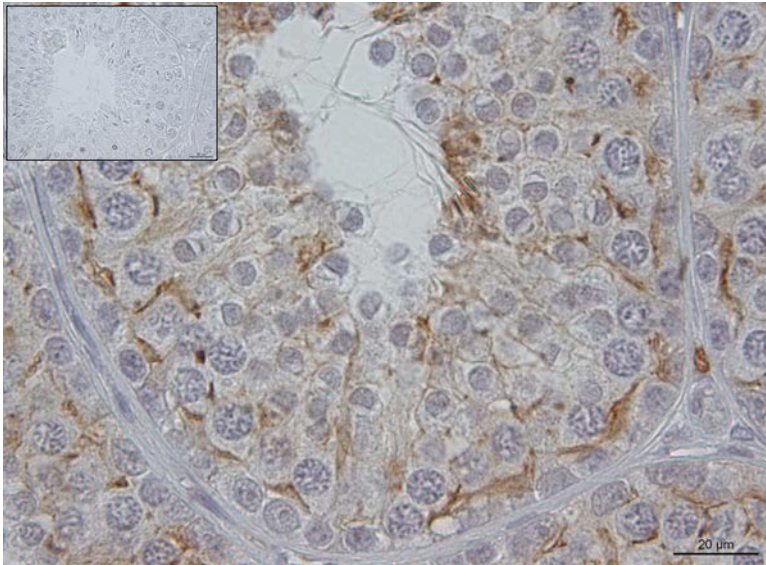


Abb. 19 D  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Bruno  
Gruppe: Woche 9 / DG D  
Vergrößerung: 400fach

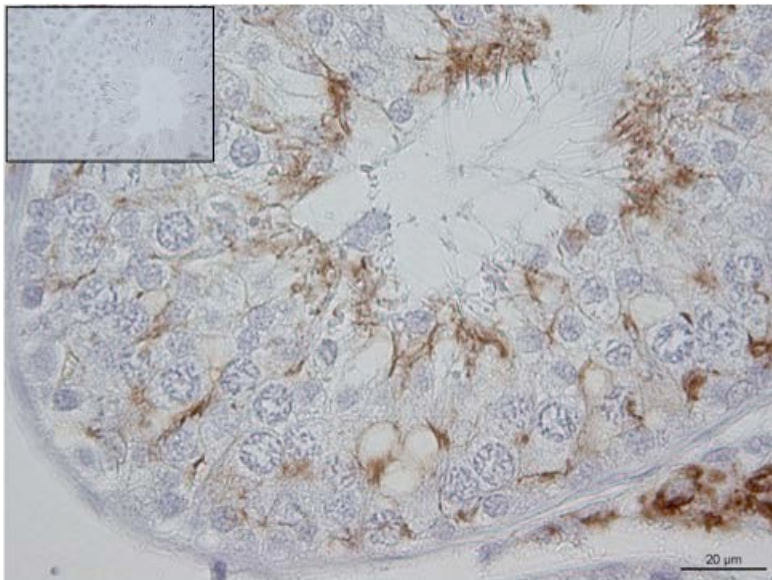


Abb. 19 E  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Elliot  
Gruppe: Woche 12  
Vergrößerung: 400fach

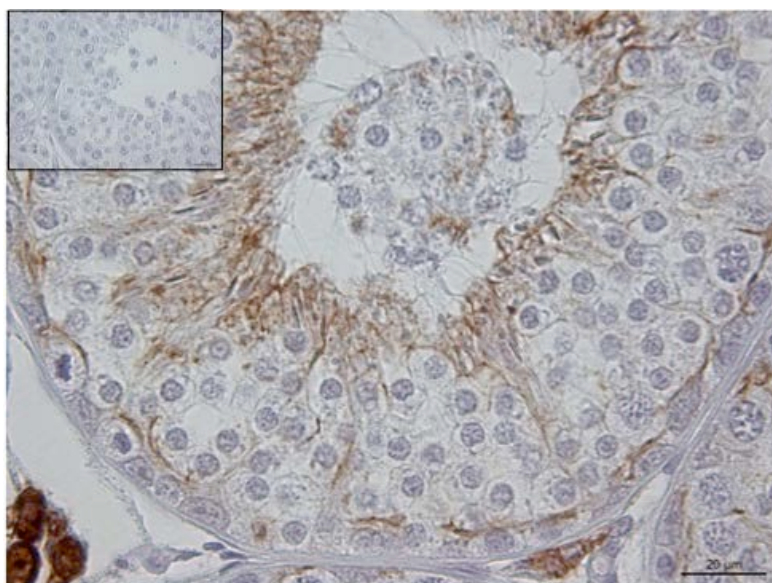


Abb. 19 F  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Theo Jentzsch  
Gruppe: Woche 24  
Vergrößerung: 400fach



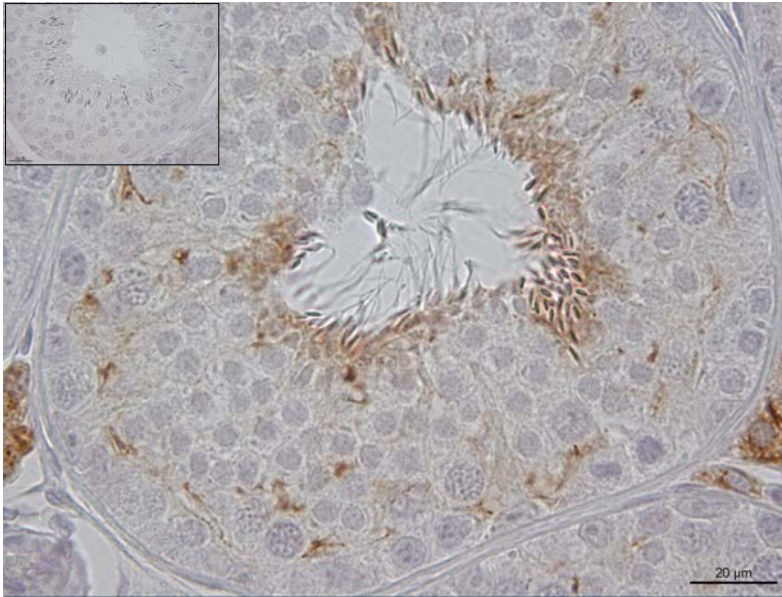


Abb. 19 G  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Tom  
Gruppe: adult  
Vergrößerung: 400fach

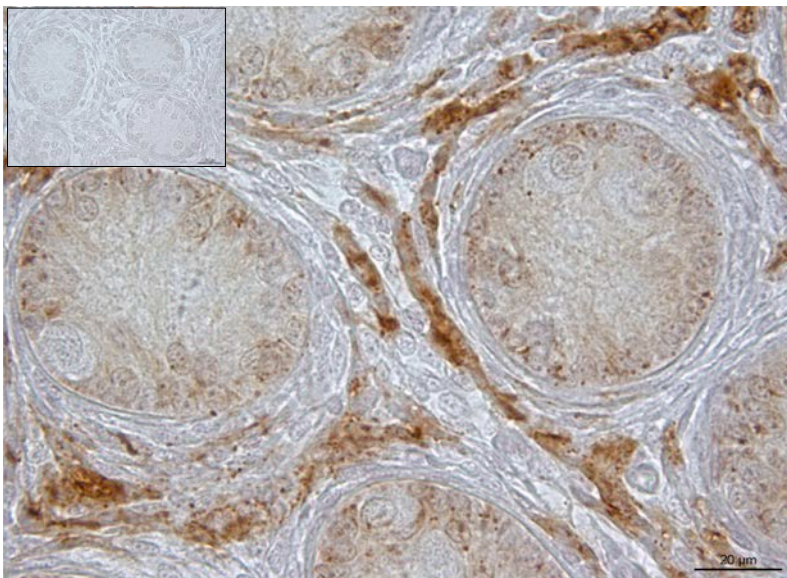


Abb. 19 H  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Averell Dalton  
Gruppe: juvenil  
Vergrößerung: 400fach

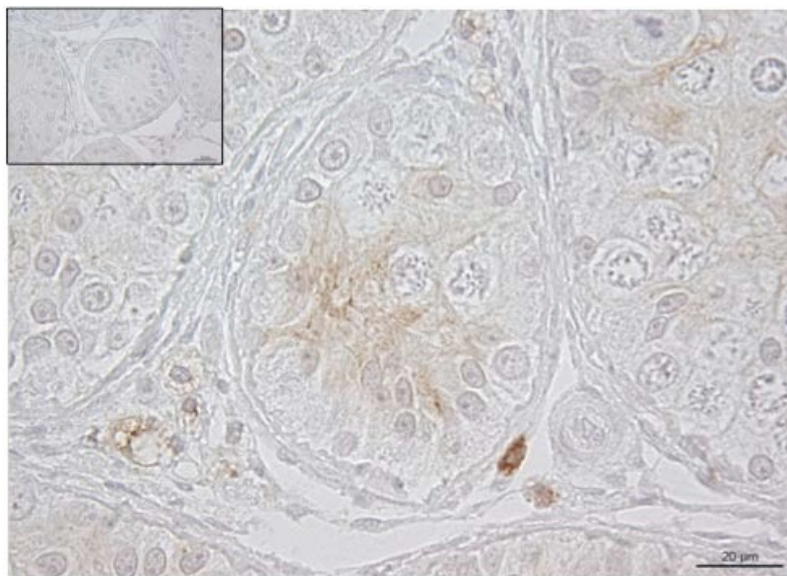


Abb. 19 I  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Sid  
Gruppe: „Profact“  
Vergrößerung: 400fach

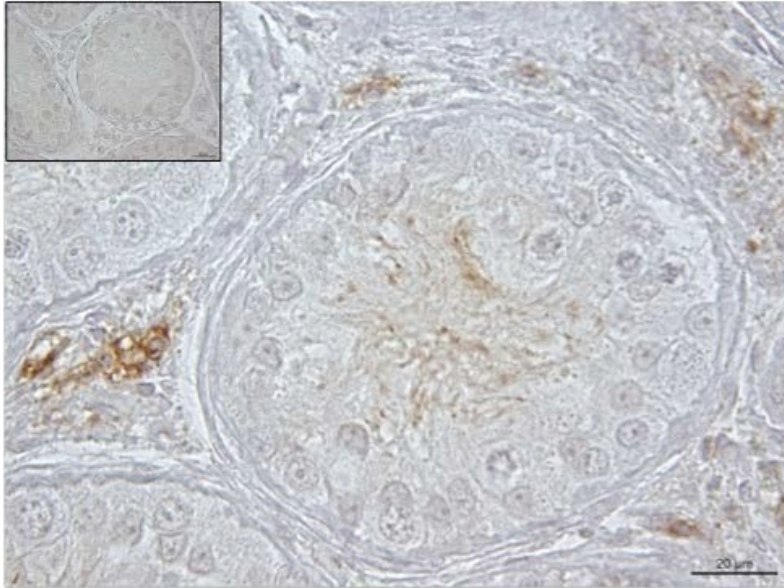


Abb. 19 J  
Immunhistochemischer  
Nachweis des caninen Cx43-  
Proteins mittels Cx43 #3512  
Hund: Jan  
Gruppe: „Suprelorin“  
Vergrößerung: 400fach

### 4.2.2.1 Auswertung der stagespezifischen Färbung

Beim Vergleich der Intensität des immunhistochemischen Signals in den verschiedenen Stages des Keimepithels mit vollständiger Spermatogenese (DG D, CG) wurden aufgrund eines ähnlichen Färbeverhaltens in Übereinstimmung mit Ähnlichkeiten im zeitlichen Ablauf der Spermatogenese bezogen auf die Spermiation Stage II und III sowie Stage VI und VII gemeinsam beurteilt. Bei der Auswertung der Immunreaktion zeigte sich in der statistischen Auswertung für das Signal apikal der Spermatogonien bereits im Kruskal Wallis Test ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Bei der Gegenüberstellung der Stages I, II und III, IV, V, VI und VII sowie VIII war das Signal in Stage IV am stärksten ausgeprägt, d.h. sowohl signifikant stärker als in Stage I ( $p < 0,009$ ) als auch als in Stage II und III, Stage V, Stage VI und VII und Stage VIII ( $p < 0,0001$ ). Die geringste Ausprägung zeigte sich in Stage VI und VII im Vergleich zu Stage II und III, Stage V ( $p < 0,0001$ ) und Stage VIII ( $p < 0,0004$ ). In den Stages V, VI und VII, die 2 Generationen primärer Spermatozyten aufweisen, konnten ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Kruskal Wallis  $p < 0,0001$ ) diese zeigten, dass in Stage V eine signifikant geringere Signalausprägung zwischen den beiden Generationen als in Stage VI und VII vorlag. Auch für das Signal apikal der primären Spermatozyten (Kruskal Wallis  $p < 0,0001$ ) zeigten Stage VI und VII eine signifikant niedrigere Immunreaktion im Vergleich zu Stage I ( $p < 0,0002$ ), Stage II und III, Stage IV sowie Stage V ( $p < 0,0001$ ). Weitere Unterschiede zeigten sich von Stage V im Vergleich zu Stage II und III

( $p < 0,03$ ), Stage IV ( $p < 0,009$ ) und Stage VIII ( $p < 0,0001$ ). Weiterhin ist das immunhistochemische Signal in Stage VIII signifikant geringer als in Stage I ( $p < 0,0002$ ) und in Stage IV ( $p < 0,0001$ ).

### 4.2.2.2 Binarisierung

In der Tabelle 17 und der Abbildung 20 sind als Maßstab für das Ausmaß der Immunreaktion die Ergebnisse und die statistische Auswertung des Flächenanteils der immunopositiven Bezirke (PIA) innerhalb der Tubuli in Prozent dargestellt. Die einfaktorielle Varianzanalyse ließ in allen untersuchten Kollektiven einen Einfluss erkennen. Für das Kollektiv 1 ergab sich in der ANOVA eine Signifikanz von  $p = 0,0007$ , für das Kollektiv 2 lag der p-Wert bei  $p = 0,0033$  und für Kollektiv 3 bei  $p = 0,0160$ . Im anschließenden paarweisen Gruppenvergleich zeigte sich, dass die Gruppe DG B mit 12,21% im Vergleich zu den Gruppen DG D und CG ( $p < 0,01$ ) sowie die Wo3 mit 14,03% im Vergleich zu den Gruppen Wo12 und CG ( $p < 0,01$ ) den mit Abstand größten Flächenanteil an immunopositiven Bezirken im Tubulus aufwiesen. Weitere Signifikanzen ließen sich zwischen der Gruppe DG D zu den Gruppen DG A und DG C ( $p < 0,05$ ) sowie der adulten Kontrollgruppe zu der Gruppe DG C nachweisen. Im 3. Kollektiv war die Gruppe JG zu den Gruppen PG und CG signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis von Connexin43, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke im Tubulus (PIA) in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation

Gruppen	PIA
PG	1,39 ( 0,84 – 2,06)
SG	2,86 ( 0,90 – 5,88)
JG	9,13 ( 5,06 – 14,24)
DG A	7,64 ( 4,03 – 12,28)
DG B	12,21 (11,00 – 13,48)
DG C	8,07 ( 4,18 – 13,08)
DG D	1,95 ( 0,59 – 4,06)
CG	2,57 ( 1,16 – 4,51)
Woche 0	6,36 ( 3,28 – 10,38)
Woche 3	14,03 (11,82 – 16,40)
Woche 6	5,84 ( 3,83 – 8,23)
Woche 9	4,55 ( 1,10 – 10,20)
Woche 12	1,43 ( 0,38 – 3,14)
Woche 24	4,30 ( 1,76 – 7,90)

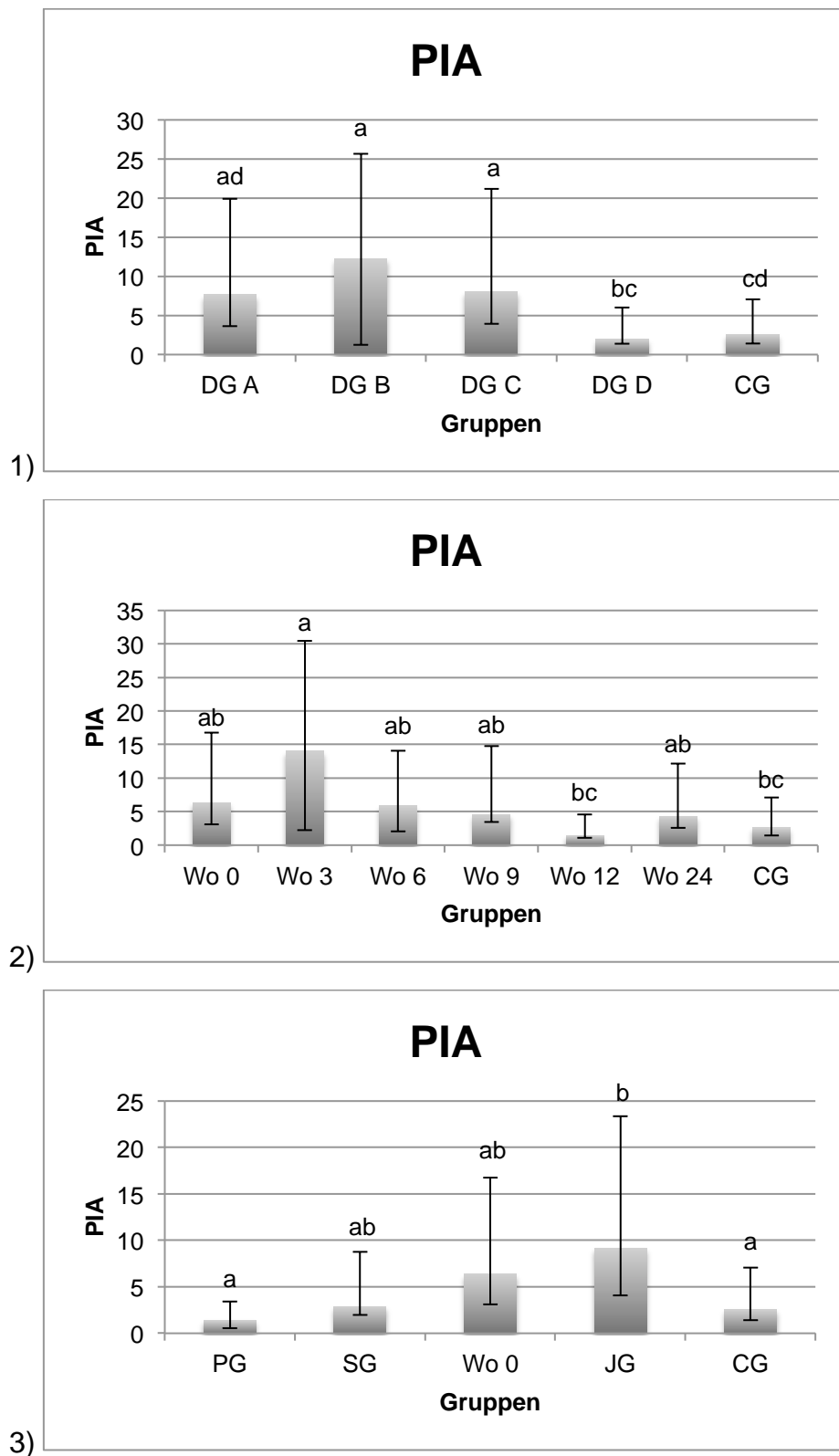


Abb. 20 Immunhistochemischer Nachweis von Connexin43, Flächenanteil der immunopositiven Bezirke im Tubulus (PIA) in %, modif. 1s-Bereich nach arcsin-Transformation, 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b:c:d  $p < 0,05$ .

## 4.2.2.3 Grauwertanalyse

Bei der statistischen Auswertung des mittleren Grauwerts der immunpositiven Pixel wurden mittels ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen des Kollektiv 1 ( $p=0,0040$ ) und des Kollektiv 2 ( $p=0,0024$ ) nachgewiesen. So wies im Kollektivs 1 die Gruppe DG C einen signifikant geringeren mittleren Grauwert im Vergleich zu den Gruppen DG A ( $p<0,01$ ), DG D und CG ( $p<0,05$ ) auf. Bei Betrachtung des Kollektivs 2 unterscheiden sich die Gruppen Wo0 mit Wo6 ( $p<0,01$ ) und Wo12 ( $p<0,05$ ) sowie die Wo6 mit Wo3 und der Gruppe der adulten Hunde ( $p<0,05$ ) signifikant (Tabelle 18, Abb. 21).

Tabelle 18: Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins, mittlerer Grauwert der immunpositiven Pixel

Gruppen	GW Cx43 ( $\bar{x} \pm SD$ )
PG	153,43 $\pm$ 0,50
SG	153,36 $\pm$ 0,54
JG	153,50 $\pm$ 0,22
DG A	153,81 $\pm$ 0,24
DG B	153,37 $\pm$ 0,39
DG C	151,83 $\pm$ 1,24
DG D	153,34 $\pm$ 0,33
CG	153,30 $\pm$ 0,54
Woche 0	153,92 $\pm$ 0,14
Woche 3	153,71 $\pm$ 0,50
Woche 6	151,24 $\pm$ 0,55
Woche 9	152,05 $\pm$ 1,52
Woche 12	151,60 $\pm$ 1,41
Woche 24	152,11 $\pm$ 0,63



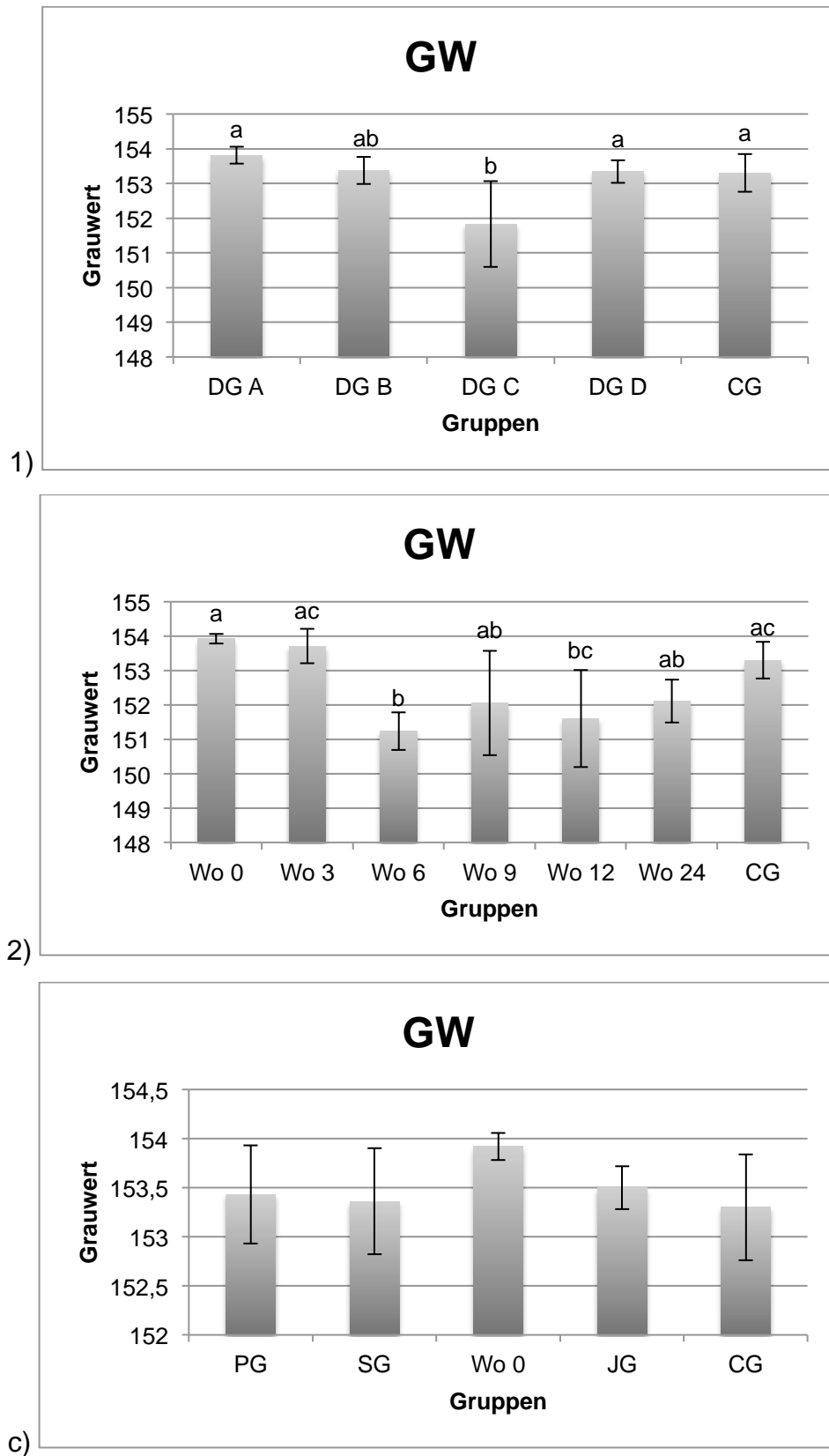


Abb. 21 Immunhistochemischer Nachweis des Cx43-Proteins, mittlerer Grauwert der immunopositiven Pixel ( $\bar{x} \pm SD$ ), 1) Kollektiv 1, DG A – D und CG 2) Kollektiv 2, Wo0 – 24 und CG 3) Kollektiv 3, Wo0, PG, SG, JG und CG, a:b:c  $p < 0,05$ .

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.2 Angewendetes Modell

Die Downregulation mittels GnRH-Implantat ist mittlerweile eine etablierte Methode zur Unterdrückung der Gonadenfunktion und bereits durch zahlreiche Studien verschiedener Arbeitsgruppen beschrieben (Vickery et al., 1984; Riesenbeck et al., 2002; Goericke-Pesch et al., 2009; Ludwig et al., 2009). Jedoch gibt es noch keine genaueren Untersuchungen über den Einfluss auf Gap- und Tight-Junction Proteine und die damit in Verbindung stehende Integrität der Blut-Hoden-Schranke.

Die hier vorliegende Studie bedient sich dem von Goericke-Pesch et al. (2009) publizierten Modell der Downregulation. Hierbei wurde eine Gruppe von Beagle-Rüden mittels des GnRH-Implantates „Gonazon®“ über 5 Monate behandelt und nach Wirkungsende über einen Zeitraum von 24 Wochen jeweils in Gruppen von 3-4 Hunden im Abstand von 3 Wochen kastriert. Da die einzelnen Hunde eine individuell unterschiedlich schnelle Rekrudescenz der Spermatogenese zeigten, wurden die Hunde anhand der am weitesten entwickelten Keimzellstadien in developmental groups eingeteilt. Auf Grund der schneller als erwartet stattfindenden Aufregulierung ergaben sich kleinere Gruppen als beabsichtigt. Da bei dieser Einteilung schon das Vorhandensein einer einzigen für die entsprechende Gruppe festgelegte Keimzelle ausreichte, um in diese Gruppe eingeteilt zu werden, ergaben sich zudem innerhalb dieser kleinen Gruppen große Unterschiede im histologischen Bild. Um den Einfluss der unterschiedlichen Kastrationszeitpunkte bei diesen Unterschieden beurteilen zu können, wurde zusätzlich eine Einteilung in Gruppen von 3 Hunden nach den Wochen der Kastration vorgenommen. Da aufgrund der verschiedenen Einflussfaktoren nur relativ kleine Gruppen gebildet werden konnten, ist die statistische Aussagekraft der durch die Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse eingeschränkt. Generell ist jedoch davon auszugehen, dass die Aussage über Tendenzen nicht beeinflusst wird.

Zur Untersuchung der BTB im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese wurden das Gap-Junction Protein Connexin43 sowie die Tight-Junction-Proteine Occludin, Claudin-3, -5 und -11 untersucht. Diese 5 Proteine wurden ausgewählt, da

sie die Grundstrukturen von GJ (Yeager und Nicholson, 1996; Saez et al., 2005) bzw. von TJ (Gonzalez-Mariscal et al., 2003) bilden und somit einen wesentlichen Bestandteil der BTB darstellen (Carette et al., 2010; Li et al., 2010; Morrow et al., 2010). Um die Funktionalität der Sertoli-Zelle im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen zu charakterisieren, erfolgte zusätzlich die Ausmessung der Fläche der Sertoli-Zellkerne.

### 5.1.3 Ausmessung der Fläche der Sertoli-Zellkerne

Für die Charakterisierung und Ausmessung der Sertoli-Zellkerne wurden diese mit einem Vimentin-Antikörper angefärbt. Dies ermöglicht die eindeutige Identifikation der Sertoli-Zellen und ihrer Kerne, da die Sertoli-Zelle als einzige Zelle in den Tubuli seminiferi contorti (Aumüller et al., 1988) und unabhängig vom Entwicklungszustand (präpubertär bis adult) Vimentin exprimiert (Paranko et al., 1986; Aumüller et al., 1992; Rogatsch et al., 1996). Weitere Merkmale der Sertoli-Zellen sind der deutlich sichtbare Nukleolus sowie die Anordnung entlang der Basalmembran (Foote et al., 1972; Lebelo und van der Horst, 2010). Diese Kriterien ermöglichten nach einer kurzen Einarbeitungs- und Übungsphase die eindeutige Identifikation der Sertoli-Zellen in den Vimentin-gefärbten Schnitten.

### 5.1.4 Western-Blot

Der Western-Blot wurde durchgeführt, um die Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörpers zu bestätigen. Hierbei wurde Hodenhomogenat von adulten Hunden verwendet, in welchem das zu untersuchende Protein vorhanden sein sollte. Um die im caninen Hodengewebe detektierte Bande als spezifisch verifizieren zu können, wurde zusätzlich humanes Hodengewebe verwendet, da es sich bei dem Antikörper um einen gegen das humane Cx43-Protein gerichteten Antikörper handelte. Für den Ausschluss unspezifischer Banden wurde weiterhin eine canine Probe mitgeführt, welche nicht mit dem primären Antikörper inkubiert wurde, um Reaktionen des Sekundärantikörpers bzw. des ABC-Systems ausschließen zu können.

### 5.1.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine häufig angewendete Methode zur Visualisierung von spezifischen Proteinen innerhalb eines Gewebes mittels eines markierten Antikörpers. Diese Methode ermöglicht die genaue zelluläre Lokalisation bzw. das Kompartiment, in dem das Protein vorhanden ist, zu erfassen. Die hier angewendete indirekte Nachweismethode unter Verwendung eines Sekundärantikörpers sowie von Avidin und Biotin zeigt gegenüber dem direkten Nachweisverfahren aufgrund des hohen Enzym-Antikörper-Verhältnisses eine höhere Empfindlichkeit (Hsu et al., 1981; Key, 2009).

Durch verschiedene Vorversuche wurden auf der Grundlage des bereits in anderen Untersuchungen erfolgreich verwendeten Protokolls für die Immunhistochemie einige an die verwendeten Gewebe und Antikörper angepassten Änderungen vorgenommen und diese dann im Hauptversuch für alle Proben einheitlich angewendet. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der einzelnen Schnitte zu gewährleisten, wurden alle Proben am selben Tag in einem Durchgang gefärbt. Dies ermöglichte den Ausschluss von Unterschieden durch nicht beeinflussbare Faktoren wie zum Beispiel umweltbedingte Einflüsse.

Für die Auswertung wurde in Anlehnung an Büsges (2003) und Gentil (2012) ein standardisiertes Computerprogramm verwendet. Durch diese Methode konnte neben einer erhöhten Genauigkeit vor allem eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden. Der für die Auswertung mit ImageTool verwendete Schwellenwert (threshold) wurde im Voraus für alle zu untersuchenden Gewebeschnitte festgelegt. Die Festlegung des Schwellenwertes setzte einen ausreichenden Kontrast der immunopositiven Farbreaktion zum vorhandenen Hintergrund voraus und konnte in den Schnitten nur durch eine fehlende Gegenfärbung erreicht werden. Dies führte zur Erzeugung von objektiven und reproduzierbaren Ergebnissen.

Die Fläche des Immunopositiven Bereichs (PIA) innerhalb der Tubuli seminiferi wurde im Verhältnis zum gesamten Tubulus gesehen angegeben. Die hierbei errechneten Prozentzahlen sind also proportional zur Menge des nachgewiesenen Proteins bezogen auf die Tubulusfläche.

### 5.1.5 Nachweis von mRNA

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zum qualitativen Nachweis der mRNA Expression in einem bestimmten Gewebe und wird routinemäßig bei vielen Untersuchungen angewendet. Die (semi-)quantitative Realtime PCR/qPCR zeigt im Vergleich zur qualitativen RT-PCR eine höhere Sensitivität und ermöglicht schon den Nachweis von geringen Mengen mRNA sowie von geringen Unterschieden in der Expression (Pfaffl, 2001). Die hier angewendete SYBR Green Methode weist zwar eine hohe Sensitivität auf, resultiert aber durch die unspezifische Bindung des Farbstoffs an die DNA in einer geringen Spezifität. Diese wiederum konnte jedoch durch die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse der DNA ausgeglichen werden. Hierbei führte eine kontinuierliche Temperaturerhöhung zum Aufschmelzen der beiden DNA-Stränge bei einer für das Fragment spezifischen Temperatur. Zur Auswertung wurde bei der qPCR als Quantifizierungsmethode die relative Quantifizierung angewendet: Dabei bezieht sich die Genexpression des zur untersuchenden Gens auf ein nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ (HKG), was zu einer sogenannten Normalisierung der Expressionsergebnisse führt (Pfaffl, 2004). Dies bietet den Vorteil, dass die Varianz der Ergebnisse durch individuelle Unterschiede minimiert werden können. Als HKG wurde GAPDH verwendet, da es sich in den verschiedenen Gruppen konstant und unabhängig von der Behandlung mit Gonazon® und Profact® Depot verhielt (Gentil, 2012) und damit eine Unabhängigkeit von der Behandlung mit Suprelorin® ebenfalls zu erwarten war. Für die weitere Optimierung der Ergebnisse wurde für jedes einzelne Primerpaar eine Effizienzbestimmung anhand einer Verdünnungsreihe aus einem Pool aller zu untersuchenden Proben durchgeführt, die bei der Berechnung der Expressionsunterschiede herangezogen wurde. Dies minimierte zusätzlich die Gefahr der Über- oder Unterschätzung des tatsächlichen mRNA-Gehaltes (Pfaffl et al., 2002).

### 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die BTB anhand der Expression von Cx43, OCLN, CLDN-3, -5 und -11 während der Rekrudescenz der Spermatogenese nach Downregulation infolge eines slow release GnRH-Agonist-Implantates beim Rüden

untersucht. Die BTB spielt im Verlauf der Spermatogenese eine essentielle Rolle und ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung eines speziellen Mikromilieus innerhalb der Tubuli seminiferi beteiligt. Die Sertoli-Zelle nimmt mit ihrer Stütz- und Ernährungsfunktion sowie als Grundgerüst für die Ausbildung der BTB eine zentrale Rolle im Hoden und damit den vorliegenden Untersuchungen ein.

Die Untersuchungen der Sertoli-Zelle in Form von Messung der Zellkerngröße zeigten, dass es infolge der Behandlung zur Verkleinerung der Sertoli-Zellkerne und infolgedessen zu einer Verkleinerung der gesamten Sertoli-Zelle kam (Russell et al., 1990d; Junaidi et al., 2009). In den vorliegenden Untersuchungen waren die Sertoli-Zellkerne zum Zeitpunkt der Downregulation der Spermatogenese signifikant kleiner (DG A, PG, SG und Wo0) als in den Gruppen mit vollständiger Spermatogenese (DG D bzw. CG). Sertoli-Zellen beenden mit Erreichen der Pubertät ihre Phase der Zellteilung und haben damit ihre maximale Anzahl im Hoden erreicht (Orth, 1982; Kluin et al., 1984; Brehm und Steger, 2005). Weitere Volumenveränderungen im Hoden lassen sich nach der Pubertät nur noch auf eine Größenzu- oder abnahme der bereits bestehenden Sertoli-Zellen zurückführen. Da an derselben Hundepopulation während der Downregulation eine signifikant reduzierte LH, FSH und Testosteron-Konzentration nachweisbar war (Goericke-Pesch et al., 2009), erscheint es plausibel, dass es infolge des Wegfalls des stimulierenden Effekts von Testosteron und FSH zu der beobachteten Sertoli-Zellkern Atrophie kam. Die Atrophie der Sertoli-Zellkerne ist mit einer reduzierten Sertoli-Zellaktivität infolge der hormonellen Downregulation korreliert (Sinha Hikim et al., 1989).

Um die BTB während der Downregulation und im Verlauf der Rekrudezenz der Spermatogenese näher charakterisieren zu können wurden einzelne Bestandteile dieser Barriere als Maß für die Entwicklung der BTB untersucht.

Allgemein bekannt ist, dass sich die BTB aus verschiedenen Zell-Zell-Verbindungen zusammensetzt, die im Zusammenspiel eine effektive Barriere zwischen dem Kreislauf- und Immunsystem und dem Inneren der Tubuli seminiferi bilden. Eine dieser Zellverbindungen stellen die GJ dar, welche aus den Connexinen aufgebaut sind. Das bekannteste Protein der Connexin-Familie ist Cx43. Dieses konnte bereits im Hoden verschiedener Spezies (Risley et al., 1992; Pelletier, 1995; Steger et al., 1999; Brehm et al., 2006; Hejmej et al., 2007), auch beim Hund (Rüttinger et al., 2008) beschrieben werden und gilt als Bestandteil der BTB (Decrouy et al., 2004;

Rüttinger et al., 2008). Die interzelluläre Kommunikation der verschiedenen Zellen im Hoden via Cx43 Kanäle ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung der männlichen Keimzelllinie (Roscoe et al., 2001); so führt ein auf den Hoden beschränkter konditionaler knockout des Cx43 Gens am Mausmodell zum Arrest der Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien (Brehm et al., 2007; Sridharan et al., 2007). Auch beim Menschen konnte bei infertilen Patienten bereits eine signifikant geringere Cx43-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Defamie et al., 2003).

Connell (1980) gelang es bereits 1980 unmittelbar postnatal, elektronenmikroskopisch am caninen Hoden zwischen den Sertoli-Zellen GJ nachzuweisen. In dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls in der Immunhistochemie bereits am juvenilen caninen Hoden ein diffus verteiltes v.a. basal lokalisiertes, positives Signal innerhalb der Tubuli seminiferi contorti aber auch in den interstitiellen Leydig-Zellen. Im Gegensatz hierzu war das immunopositive Signal bei präpubertären Mäusen initial auf das adluminale Kompartiment beschränkt (Batias et al., 2000); erst um den Tag 16 postnatal kam es zeitgleich mit der Ausbildung einer funktionellen BTB [Tag 10 bis 16 (Cyr et al., 1999)] zu einer Färbung im basalen Kompartiment (Batias et al., 2000). Ähnlich der Situation bei der präpubertären Maus war das Signal im downregulierten caninen Hoden unabhängig von dem verwendeten GnRH-Agonisten adluminal zu finden. Demnach ist die BTB in ihrer Funktion als Barriere zum Schutz der antigenen Keimzellen während der Downregulation nicht existent oder zumindest funktionell. Im Verlauf der Rekrudeszenz der Spermatogenese kam es zu einer Verlagerung des Signals aus dem adluminalen in das basale Kompartiment. In DG C und DG D sowie in den Wo6, -9, -12 und -24 zeigte sich dann wie in CG ein charakteristisches immunhistochemisches Bild mit einer immunopositiven Reaktion zirkulär oberhalb der Spermatogonien und unterhalb der primären Spermatozyten (Steger et al., 1999; Decrouy et al., 2004; Rüttinger et al., 2008). Diese Veränderung der Lokalisation des immunhistochemischen Signals von einer diffusen Verteilung sowohl bei der Gruppe der juvenilen Hunde als auch im downregulierten Hoden zu einer Konzentration im basalen Bereich der BTB konnte durch die Untersuchung des Flächenanteils der immunopositiven Bezirke (PIA) innerhalb der Tubuli seminiferi bestätigt werden. Hier zeigten sich in der Gruppe der juvenilen Hunde signifikant höhere Werte im Vergleich zu CG. Auch die Gruppen DG B bzw. Wo3 wiesen signifikant höhere Werte im Vergleich zu den Gruppen DG D

bzw. Wo12 und CG auf. Die Gesamtheit der Ergebnisse lässt darauf schließen, dass es mit dem Wiederanlaufen der Spermatogenese zur erneuten Formation der BTB und der damit verbundenen Ausbildung der beiden Kompartimente kommt. Dabei teilt sich das Keimepithel in ein basales Kompartiment, bestehend aus den basal gelegenen Keimzellen, den Spermatogonien und preleptotänen Spermatozyten, und ein adluminale Kompartiment, welches Spermatozyten und Spermatiden beinhaltet (Dym und Cavicchia, 1977; Yazama, 2008). Die Ausbildung der Kompartimente wird in der Immunhistochemie bei den Hunden mit vollständiger Spermatogenese besonders deutlich. Bei anderen Spezies (Mensch, Maus, Ratte) konnte bereits eine stadien-spezifische Expression von Cx43 nachgewiesen werden, wobei die Expression in den Stadien der Wanderung preleptotäner Spermatozyten aus dem basalen in das adluminale Kompartiment deutlich reduziert war (Risley et al., 1992; Steger et al., 1999; Decrouy et al., 2004). Auch die hier gemachten Beobachtungen zeigen eine Reduzierung des Signals in den Stages VI und VII. Interessanterweise kommt es zeitgleich innerhalb dieser Stages zu einer signifikanten Zunahme des Signals zwischen primären Spermatozyten 1. und 2. Generation. Dies weist zum einen in Anlehnung an die Erkenntnisse bei Mensch und Ratte auf eine temporäre Auflösung der BTB für die Wanderung der preleptotänen Spermatozyten hin, gibt aber ebenso einen Hinweis auf die Ausbildung eines wie von Russell (1977) beschriebenen 3. intermediären Kompartiments zur Aufrechterhaltung der Integrität der BTB. Auf mRNA- und Proteinebene in DG B bzw. Wo3 liegen die höchsten Werte vor, wobei sich nur Wo3 signifikant unterscheidet; die Ergebnisse in DG D und Wo24 sind zwar höher als während der Downregulation, aber niedriger als unmittelbar nach Wegfall der Downregulation (DG B/Wo3), was auf ein mögliches Reboundphänomen hindeuten könnte. Dieses konnte tendenziell bereits ebenfalls für die Testosteronkonzentration (Goericke-Pesch et al., 2009) sowie StAR und die steroidogenen Enzyme (Gentil, 2012) nachvollzogen werden. Auch hier waren die ermittelten Werte der Gruppen DG B im Vergleich zu den Gruppen DG D und CG sowie Wo3 im Vergleich zu Wo12 und CG signifikant höher. Unter dem bereits in der Literatur mehrfach beschriebenen Aspekt der positiven Korrelation zwischen der in der Pubertät ansteigenden Testosteronkonzentration und der ebenfalls mit Beginn der Pubertät vorliegenden Formierung der BTB scheint ein im Verlauf der Rekrudescenz ähnlicher Expressionsverlauf von Testosteron und einzelnen Komponenten der BTB plausibel.



Einen weiteren wichtigen Bestandteil der BTB bilden die TJ zwischen den Sertoli-Zellen (Russell und Peterson, 1985). Dies sind spezifische Zellverbindungen, welche innerhalb dieser Barriere vor allem für die Aufrechterhaltung der Integrität verantwortlich sind. Durch die Ausbildung einer dichten gürtelähnlichen Struktur bilden die TJ-Stränge eine Barriere für Wasser, Ionen, gelöste Stoffe und Immunzellen und sorgen so für die Aufrechterhaltung der im Gewebe herrschenden Homöostase (Anderson und Van Itallie, 1995; Hartsock und Nelson, 2008). Das Grundgerüst der TJ bilden die Transmembranproteine, Occludin und die Proteine der Claudinfamilie.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die vier TJ bildende Transmembranproteine: Occludin, Claudin-3, -5 und -11 im Verlauf der Rekrudeszenz der Spermatogenese untersucht.

Alle 4 TJ-Proteine konnten bereits im Hodengewebe verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Moroi et al., 1998; Cyr et al., 1999; Morita et al., 1999b; Hellani et al., 2000; Meng et al., 2005; Kaitu'u-Lino et al., 2007; Tarulli et al., 2008; Morrow et al., 2009; Mazaud-Guittot et al., 2010). Allerdings wurde bislang einzig OCLN als eines der TJ-Proteine im basalen Bereich der Sertoli-Zelle im caninen Hodengewebe detektiert; die Untersuchungen waren zudem ausschließlich auf die Proteinebene beschränkt. Die Beschreibung der mRNA-Expression von OCLN sowie der CLDN am caninen Hoden erfolgt im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig. Bei der Maus führte der Verlust von OCLN zur Infertilität der männlichen Tiere bedingt durch ein SCO (Sertoli-cell-only-Syndrom), d.h. einen kompletten Schwund der Keimzellen bei ausschließlichem Vorhandensein von Sertoli-Zellen (Saitou et al., 2000). Die Bedeutung dieses Proteins für die Integrität der BTB konnte ebenfalls von Chung und Cheng (2001) durch eine induzierte Störung der OCLN-OCLN-Interaktion und einem darauf folgenden Verlust der Spermatozyten und Spermatischen einhergehend mit einer erhöhten Durchlässigkeit der BTB gezeigt werden (Chung und Cheng, 2001).

Im Verlauf des Wiedereinsetzens der Spermatogenese und der damit verbundenen Neuformierung der BTB kommt es zu einem Anstieg der mRNA-Expression von OCLN von DG A zu DG D. Im Wochengruppenvergleich konnte ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Wo0 bis zu Wo6 verifiziert werden. Danach ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen

den Wochengruppen, jedoch war die Ratio von Wo9 bis 24 vergleichsweise geringgradig niedriger als in Wo6. Weder die Wo12 und 24 noch DG D wiesen hinsichtlich der mRNA Expression signifikante Unterschiede zu CG auf. Auch im Vergleich der mit jeweils unterschiedlichen GnRH-Agonist Implantaten behandelten Gruppen PG, SG und Wo0 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass alle Implantate in Bezug auf die mRNA-Expression von OCLN unter Downregulation den gleichen Status hervorrufen. Der mit der Entstehung der BTB zeitgleiche Expressionsanstieg von OCLN lässt auf eine Relevanz dieses Proteins für die Integrität der BTB beim Hund, wie auch bei der Ratte (Chung und Cheng, 2001) schließen. Allerdings zeigt sich am downregulierten Hoden nicht wie von Carette et al. (2010) beschrieben eine infolge des Cx43 Abfalls bedingter Anstieg von OCLN. Dies deutet darauf hin, dass die hormonelle Downregulation weitere auf die OCLN-Expression einwirkende Faktoren beeinflusst.

Claudine, die wie OCLN Grundbestandteil der TJ sind, gelten seit ihrer Erstbeschreibung ebenfalls als wichtige barriere-bildende Proteine dieser Zell-zu-Zell-Verbindungen (Furuse et al., 1998). Sowohl für OCLN als auch für CLDN-3 liegen Untersuchungen zu einer speziesabhängigen Rolle dieser beiden Proteine für die Integrität der BTB vor (Moroi et al., 1998; Cyr et al., 1999; Li et al., 2006; Tarulli et al., 2008). Im Gegensatz zu OCLN, bei welchem bereits ein Nachweis im caninen Hodengewebe erfolgte (Gye, 2004) begründet sich die Annahme für CLDN-3 auf Untersuchungen bei verschiedenen anderen Spezies. So zeigen Mäusen bereits an Tag 15 postnatal eine erste mRNA-Expression im Hodengewebe. Im Gegensatz dazu konnte CLDN-3 nicht im Keimepithel von Ratten detektiert werden (Kaitu'u-Lino et al., 2007) und zeigt sich beim Dsungarischen Hamster im Bereich der BTB nur während des Übergangs von der saisonal inaktiven in die aktive Spermatogenese (Tarulli et al., 2008). Betrachtet man den Hoden jedoch im Gesamten konnte CLDN-3 bei jeder der drei oben genannten Spezies ebenso im Interstitium nachgewiesen werden (Meng et al., 2005; Kaitu'u-Lino et al., 2007; Tarulli et al., 2008). Es muss also bei den hier ermittelten Werten berücksichtigt werden, dass für die Durchführung der qPCR mRNA Gesamthodenhomogenat verwendet wurde, weshalb kein Rückschluss auf die exprimierenden Kompartimente beim Hund möglich ist. Während für alle anderen untersuchten Proteine signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen in unterschiedlichen Stadien der Downregulation befindlichen Gruppen

festgestellt werden konnten, zeigte sich bei CLDN-3 ausschließlich eine signifikant höhere Expression von SG im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen JG und CG. Dieser vergleichsweise hohe Wert von SG lässt sich auch bei den anderen downregulierten Gruppen (PG, Wo0) nachvollziehen und deutet auch hier auf eine wirkstoffunabhängige Veränderung der mRNA-Expression unter Downregulation hin. Weiterhin zeigen die juvenile und adulte Kontrollgruppe wie bereits bei der Maus beschrieben ähnlich niedrige Werte. Dieser Verlauf könnte dafür sprechen, dass im caninen Hodengewebe ein ähnliches Expressionsmuster vorliegt wie bei der Maus (Meng et al., 2005) mit einem postnatalen Expressionsanstieg von Tag 15 zu Tag 20 mit einem darauffolgenden allmählichen Abfall während der Pubertät bis hin zum adulten Tier.

Claudin-5 weist im Vergleich zu allen anderen Mitgliedern der Claudin-Familie die Besonderheit auf, dass es vor allem in Endothelzellen nicht aber in den für CLDN typischen Epithelzellen exprimiert wird (Morita et al., 1999c; Nitta et al., 2003). Dennoch konnten Morrow et al. (2009) in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Expression von CLDN-5 und den Penetrationseigenschaften der BTB nachweisen, was eine Funktion dieses Proteins im Aufbau der BTB nahe legt. In dem untersuchten Modell war die mRNA-Expression von CLDN-5 in den Gruppen Wo0, DG A, SG und PG stark erhöht im Vergleich zu den Gruppen DG B – DG D, Wo3 – Wo24 und CG wobei in PG und SG die Ratio auch signifikant höher war als in Wo0. Es liegt nahe, dass CLDN-5 auch im caninen Hodengewebe wie bei anderen Spezies (Morrow et al., 2009; Morrow et al., 2010) insbesondere im Rete testis und in den interstitiellen Blutgefäßen exprimiert wird. Da die durchgeführten Untersuchungen auf Gesamthodenhomogenat beschränkt sind erscheinen weiterführende Untersuchungen zur Quantifizierung der mRNA-Expression nach Laser-assisted Cell picking sowie auf Proteinebene sinnvoll, um die Bedeutung von CLDN-5 an der BTB beim Hund und im Rahmen der Rekrudeszenz nach Downregulation abschließend zu klären. Sofern die Expression verstärkt im Interstitium lokalisiert sein sollte, könnte die hohe Expression während der Downregulation möglicherweise in der im Verlauf der Downregulation nachgewiesenen signifikanten relativen Erhöhung der interstitiellen Fläche und des Gefäßanteils liegen (Gentil, 2012). Weitere Parallelen bestehen beim Expressionsverlauf von CLDN-5 zur Maus, wo die höchste Expression postnatal

vorliegt; auch die juvenilen Hunde zeigen verglichen mit den Gruppen DG B - DG D und CG sowie Wo3 bis Wo24 die höchsten Werte, welche wiederum - wie ebenfalls bei der Maus beschrieben - mit zunehmender Entwicklung eine Abnahme der Werte aufwiesen (Morrow et al., 2009).

Auch CLDN-11 konnte bereits als Bestandteil der TJ-Stränge zwischen benachbarten Sertoli-Zellen identifiziert werden und ist damit ebenso am Aufbau der BTB beteiligt (Morita et al., 1999b). So zeigt sich auch für dieses Protein das typische Expressionsmuster. Postnatal kann CLDN-11 am 13. Tag im gesamten Keimepithel nachgewiesen werden, ist ab Tag 20 aber auf die Region der BTB beschränkt (Gow et al., 1999; Morita et al., 1999b; Hellani et al., 2000; Mazaud-Guittot et al., 2010). 2008 konnten Tarulli et al. (2008) in ihrer Studie durch die Untersuchung des Penetrationsvermögens von Biotin-Tracer in das Keimepithel und zeitgleicher Untersuchung der CLDN-11 Lokalisation eine starke Korrelation der Funktionalität der BTB und der Lokalisation von CLDN-11 nachweisen (Tarulli et al., 2008). Dabei zeigte sich eine Durchlässigkeit für Biotin nur bis zu einer CLDN-11 bedingten Grenze. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten sich im Gesamtvergleich zwar teilweise Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, diese konnten aber bis auf die signifikant geringere Expression der Hunde aus Wo12 im Vergleich zu den Hunden aus Wo3 nicht weiter spezifiziert werden. Bei direkter Betrachtung der einzelnen Werte vor allem im Wochengruppen-Vergleich zeigt sich trotz einer weniger deutlichen Ausprägung ein ähnlicher Verlauf wie bereits weiter oben für Cx43 beschrieben. Im Verlauf der Rekrudeszenz kommt es zu einem leichten Anstieg von Wo0 zu Wo3 und einem darauffolgenden Abfall bis Wo12. Auch dieser Verlauf könnte ein Hinweis auf ein durch die Downregulation bedingtes Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen Regulationsfaktoren sein. So sind FSH, TNF $\alpha$  und Testosteron in der Maus bereits als Regulatoren für die CLDN-11 Expression identifiziert (Hellani 2000). Auch in Untersuchungen an den Sertoli-Zellen der Ratte zeigte sich ein Einfluss der Androgene als Co-Regulator für die CLDN-11 mRNA Expression und als Förderer für die Lokalisation sowohl von CLDN-11 als auch von OCLN in den TJ zwischen den Sertoli-Zellen (Kaitu'u-Lino et al., 2007). In vorherigen Studien konnte in unserer AG nach Anwendung eines Gonazon®-Implantates bereits nach 8 Wochen ein signifikanter Abfall sowohl von FSH als auch von Testosteron unter die Nachweisgrenze am gleichen Hundemodell nachgewiesen

werden (Goericke-Pesch et al., 2009). Der ähnliche Verlauf von CLDN-11 wie bei Maus und Ratte deutet darauf hin, dass CLDN-11 auch beim Hund diesen Regulationsmechanismen unterworfen ist.

Insgesamt gesehen konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von Cx43 sowie OCLN im caninen Hoden bestätigt werden. Infolge der Downregulation mittels eines slow release GnRH-Agonist Implantates, welches einen Arrest der Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien bzw. Spermatozyten induziert (Goericke-Pesch et al., 2009), kam es zu einer signifikanten Beeinflussung der BTB, ggf. sogar Aufhebung der BTB wie anhand der mRNA-Expression von Cx43 und OCLN und auf Protein-Ebene für Cx43 in der vorliegenden Arbeit belegt werden konnte. Für die 3 untersuchten CLDN-Proteine CLDN-3, CLDN-5 und CLDN-11, erfolgte zudem erstmals ein Nachweis auf mRNA Ebene im caninen Hoden. Dabei zeigten sich allerdings für die 3 Proteine innerhalb des Hodens teilweise stark divergierende Expressionsmuster, welche aber alle mehr oder weniger stark durch die Downregulation beeinflusst wurden. Im Vergleich aller untersuchten Proteine zeigten sich in den Gruppen DG A, Wo0, PG und SG stets ähnliche Werte, sodass insgesamt gesehen davon ausgegangen werden kann, dass alle Implantate (Gonazon®, Suprelorin®, Profact® Depot) im Bezug auf die mRNA-Expression den gleichen Status am downregulierten Hoden hervorrufen. Weiterhin zeigt sich nach vollständiger Rekrudescenz der Spermatogenese (Wo12, -24) für alle untersuchten Faktoren kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten adulten Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen zeigen Übereinstimmungen mit der schnellen Wiederherstellung der steroidogenen Funktionen und dem raschen Anstieg der Testosteron-Konzentrationen nach Entfernung des Implantates (Goericke-Pesch et al., 2009; Gentil, 2012). Dies belegt erneut den stimulierenden Einfluss der Androgene auf die Sertoli-Zell-TJ Bildung und Funktion (McCabe et al., 2012).

Die gewonnenen Ergebnisse geben im Zusammenhang mit der bereits bei anderen Spezies nachgewiesenen Funktion dieser Proteine innerhalb der BTB auch bei der Spezies Hund einen ersten Hinweis auf die Rolle für die Aufrechterhaltung einer Barrierefunktion innerhalb des caninen Hodengewebes. Um jedoch weitere Einblicke in deren Funktion im Bezug auf die BTB und im Rahmen der Downregulation beim Hund gewinnen zu können sind weitere Untersuchungen nach Laser-assisted cell

picking auf mRNA-Ebene, um den möglichen Einfluss der interstitiellen Expression einzelner Proteine auszuschließen, sowie eine Verifizierung auf Protein-Ebene nötig.

### 6. Zusammenfassung

Die Integrität der Blut-Hoden-Schranke (BTB), als wichtiger Faktor für den reibungslosen Ablauf der Spermatogenese, ist in der Literatur bereits eindeutig beschrieben. Dabei teilt die BTB das Keimepithel der Tubuli seminiferi in ein basales und ein adluminale Kompartiment und gewährleistet damit den Schutz der primären Spermatozyten und haploiden Spermatiden vor potenziell schädlichen Substanzen durch eine Passagebehinderung von Molekülen aus dem Interstitium in das adluminale Kompartiment. Einen maßgeblichen Anteil am Aufbau der BTB haben Tight- und Gap-Junctions, welche wiederum aus verschiedenen integralen Membranproteinen lokalisiert zwischen benachbarten Sertoli-Zellen aufgebaut sind. Wie bereits in verschiedenen Spezies nachgewiesen sind besonders das Gap-Junction Protein Connexin (Cx) 43 sowie die Tight-Junction Proteine Occludin (OCLN), Claudin (CLDN) -3, -5 und -11 an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion beteiligt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung der BTB im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese durch die Untersuchungen von Cx43, OCLN, CLDN-3, -5, und -11 auf mRNA-Ebene sowie Cx43 ebenfalls auf Protein-Ebene zu charakterisieren. Hierbei wurde das Modell der Downregulation mittels eines slow release GnRH-Implantates genutzt, um einen Arrest der Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien bzw. Spermatozyten zu induzieren. Die gewonnenen Daten sollten mit der Situation am juvenilen bzw. am adulten, unbehandelten Hoden verglichen werden.

23 Beagle-Rüden wurden mit einem slow release GnRH-Implant (Gonazon®, 18,5 mg Azagly-Nafarelin) behandelt, welches nach 5 Monaten nach Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion entfernt wurde. Jeweils 3-4 Rüden wurden im Intervall von 3 Wochen (Wo0-24) chirurgisch kastriert. Die Einteilung der Hunde erfolgte zum einen nach dem Zeitpunkt der Kastration (Wo-0, -3, -6, -9, -12 und 24) und zum anderen nach histologischen Charakteristika, d.h. den am weitesten entwickelten Keimzellen („developmental groups“: DG A (Spermatozyten), DG B (runde Spermatiden), DG C (elongierende Spermatiden) und DG D (elongierte Spermatiden)). Um den Effekt unterschiedlicher GnRH-Agonist Implantate zu untersuchen, wurden konform mit Woche 0 zudem je 3 Hunde mit Suprelorin®, (4,7 mg Deslorelin) bzw. Profact® Depot (6,3 mg Buserelinacetat) behandelt und

ebenfalls nach 5 Monaten während des Status der Downregulation chirurgisch kastriert. Als Kontrollgruppen diente das Hodengewebe von 5 adulten und 3 juvenilen Rüden.

Auf mRNA-Ebene gelang der Nachweis der Expression für die 5 untersuchten Gene (Cx43, OCLN, CLDN-3, -5 und -11) in allen untersuchten Gruppen mittels RT-PCR und qPCR. Dabei ergaben sich für alle untersuchten Gene mehr oder weniger deutliche Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen infolge der Downregulation und während der Rekrudescenz. Sowohl Cx43 als auch CLDN-11 zeigten in der Wochengruppe (Wo) 3 signifikant höhere Werte als in der Wo12, sowie Cx43 ebenso zu Wo24. Für OCLN zeigten sich sowohl im Wochengruppenvergleich eine signifikant geringere Expression in Wo0 und Wo3 verglichen mit Wo6, als auch im DG-Vergleich für DG A verglichen mit DG C, DG D und CG sowie für DG B im Vergleich zu DG D. CLDN-3 und -5 zeigten im Wochengruppenvergleich die stärkste Genexpression in Wo0, was sich für CLDN-5 ebenfalls im DG-Vergleich bestätigen ließ.

Für Cx43 erfolgte zusätzlich der Nachweis auf Proteinebene, wobei die Immunhistochemie eine spezifische Färbung zwischen Sertoli-Zellen und zwischen Sertoli-Zellen und basal gelegenen Keimzellen ergab. Dabei zeigten sowohl die juvenile Kontrollgruppe als auch Wo0/DG A ein diffus verteiltes Signal in den Sertoli-Zellen. Während das Signal bei Wo0/DG A vor allem adluminal zu finden war, war das Signal bei den juvenilen Hunden vor allem im basalen Bereich lokalisiert. Im Verlauf der Rekrudescenz der Spermatogenese kam es dann zu einer Verlagerung des Signals aus dem adluminalen in das basale Kompartiment. In DG C und DG D sowie in den Wo6, -9, -12 und -24 zeigte sich wie in CG ein charakteristisches immunhistochemisches Bild mit einer immunopositiven Reaktion zirkulär oberhalb der Spermatogonien und unterhalb der primäre Spermatozyten. Ähnlich der mRNA-Ergebnisse konnten auch bei der Ermittlung des Flächenanteils immunopositiver Bezirke (PIA) in der Gruppe Wo3/DG B signifikant höhere Werte als in den Gruppen Wo12/DG D und CG ermittelt werden. Mittels des Western Blots konnte die Spezifität des für die Immunhistochemie verwendeten Antikörpers bestätigt werden.

Die Expression der untersuchten Proteine weist sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene auf eine Veränderung bzw. einen Zerfall der BTB im Verlauf der Downregulation hin. In Bezug auf die gewonnenen Ergebnisse scheint eine schnelle



Wiederherstellung der BTB gegeben und es zeigt sich nach vollständiger Rekrudescenz der Spermatogenese (Wo12, -24) für alle Proteine auf mRNA- und für Cx43 auch auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Kontrollgruppen. Die stadien-spezifische Proteinexpression mit einem signifikant schwächeren Signal in den Stages VI und VII deutet erstmals auch beim Hund auf eine partielle Auflösung der BTB für die Wanderung der preleptotänen Spermatozyten aus dem basalen in das adluminale Kompartiment hin.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen eindeutig auf die Funktion von Cx43, OCLN, CLDN-3, -5 und -11 für die BTB beim Hund hin. Während sich durch die Downregulation signifikante Veränderungen der Proteine im Bereich der BTB ergeben, belegen die vorliegenden Daten, dass nach erfolgter Rekrudescenz der Ausgangszustand der ungestörten Spermatogenese mit intakter BTB wiederhergestellt wird, sodass die durch die Anwendung eines slow release GnRH-Agonist-Implantates induzierten Effekte nicht nur auf Ebene der Steroidogenese und anhand der morphologischen Charakteristika, sondern auch auf Ebene der BTB als vollständig reversibel angesehen werden können.

## 7. Summary

The integrity of the blood-testis-barrier (BTB) as a major factor for spermatogenesis has already been addressed in literature. The BTB separates the germinal epithelium into a basal and an adluminal compartment and protects primary spermatocytes and haploid spermatids against potentially hazardous substances by inhibiting transportation of certain molecules from the interstitium into the adluminal compartment. Tight- and Gap-Junctions consisting of various integral membrane proteins between adjacent Sertoli cells are the major component of the BTB. The Gap-Junction protein Connexin (Cx) 43 as well as the Tight-Junction proteins Occludin (OCLN), Claudin (CLDN) -3, -5 and -11 are predominantly involved in the barrier function.

Aim of the present study was to characterise the mRNA expression of Cx43, OCLN, CLDN-3, -5, and -11 and protein expression of Cx43 on the development of the BTB during recrudescence of spermatogenesis. The model of the downregulated testis was used to induce an arrest of spermatogenesis on the level of spermatogonia and primary spermatocytes. The results obtained should be compared with the juvenile and the adult canine testis.

23 male Beagle were treated with a slow release GnRH-implant (Gonazon®, 18.5 mg Azagly-Nafarelin) which was removed after five months following downregulation of the endocrine and germinative testicular function. Three to four dogs each were castrated at 3-week intervals (week 0-24). Grouping of dogs was according to the time of castration (week 0, 3, 6, 9, 12 and 24), but also according to histological criteria (the most developed germ cell observed) (developmental groups: DG A, spermatocytes; DG B, round spermatids; DG C, elongating spermatids and DG D, elongated spermatids). To test for the influence of the GnRH-agonist implant 3 dogs each were treated with a Suprelorin® (4.7 mg Deslorelin) or Profact® Depot (6.3 mg busereline acetate) implant and castrated after 5 months during downregulation. Five adult and 3 juvenile male dogs served as controls.

The 5 investigated genes (Cx43, OCLN, CLDN-3, -5 und -11) were proven in all groups using RT-PCR and RT-qPCR. More or less significant differences on the mRNA expression were found for all investigated genes between groups during downregulation and following recrudescence. mRNA expression of Cx43 and CLDN-11 was significantly higher in week (w) 3 compared to w12 and w24 (the latter Cx43

only). OCLN expression was significantly lower in w0 and -3 compared to w6; besides it was lower in DG A compared to DG C, DG D and CG as well as for DG B compared to DG D. For CLDN-3 and -5, gene expression was highest in w0 and DG A (CLDN-5).

Cx 43 was also investigated on the protein level with a specific staining being observed in immunohistochemistry between sertoli cells and sertoli cells and basal germ cells. A diffuse staining in the sertoli cells was observed in juvenile dogs and w0/DG A. However, whereas the staining was located adluminally in w0/DG A, it was located basally in the juvenile testis. During recrudescence of spermatogenesis, the immunopositive signal was relocated from the adluminal to the basal compartment. In DG C and -D, w6, -9, -12 and -24 as well as CG the characteristic staining pattern with a staining circular above the spermatogonia and below the primary spermatocytes was detected. Similarly to the mRNA expression, the percentage immunopositive area (PIA) was significantly larger in w12/DG D and CG. Western Blot was used to verify specificity of the antibody.

The expression of the investigated genes on the mRNA and protein level points to a disintegration of the BTB during downregulation. Reorganisation of the BTB occurs rapidly with no significant difference being detected following recrudescence (w12, w24) compared to the untreated adult controls. The stage-specific staining with a significantly lower immunopositive signal in stages Vi and VII points to a partial disintegration of the BTB for migration of preleptotene spermatocytes from the basal to the adluminal compartment.

The results obtained underline the function of Cx 43, OCLN, CLDN-3, 5 and 11 for the BTB in the dog. Significant changes occur during downregulation. Following recrudescence, spermatogenesis including the BTB recovered completely leading to the conclusion that the effects induced by treatment with a slow release GnRH-agonist implant are fully reversible – not only regarding steroidogenesis and morphological characteristics as shown before- but also regarding the BTB.

**A. Anhang****A.1 Stoffe und Reagenzien**

AEC	Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Agarose	
Ammoniumperoxidisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
AmpliTaq GOLD™	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Avidin	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA
Biotin	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Bovines Serum Albumin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Connexin 43 Antibody	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Chlorwasserstoffsäure 2mol	Fluka™Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
DNase I / RNase frei	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, D
dNTP	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

GelGreen	Biotium, Inc. Hayward, CA, USA
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
Hämatoxilin	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ladepuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
Low Range DNA Ladder	Larova GmbH, Teltow, D
MagnesiumChlorid	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Nova Red™ Substrate Kit	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
PCR-Puffer	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Polymerase	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
QIA-quick® PCR-Purification Kit 50	QIAGEN GmbH-Deutschland, Hilden, D
Random Hexamers	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
RNase Inhibitor	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
Rotiphorese® 10xSDS-PAGE	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Rotiphorese® 10xTAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

---

Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
SYBRGreen	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Tetrametylenhylethylendiamin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trizol Reagent	Ambion® Life Technologies GmbH Darmstadt, D
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Tween®20 Sigma Ultra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Xylene	VWR International S.A.S., ProLabo® Fontenay sous Bois, F
Ziegenserum	Vectastain® Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc; USA

## A.2 Verbrauchsmaterialien

DakoPen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Deckgläschen	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, D
Glasröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
KimTech Tuch	Kimberley Clark Professional, Dallas, USA
Kunststoff-Einmalküvetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Microseal® 'B' Film	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Objekträger Superfrost®Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D

Objekträger	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, D
Parafilm	American National Can Group Inc. Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D
Pipetten	Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK
PVDF-Membran	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D
Thermo fast 96 skirted PCR Plate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Tubes 0,6 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D

### A.3 Verwendete Geräte

Brutschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D
C1000™ thermal cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Durchlichtmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Einmalklingen Disposable Microtome Blade	Leica, Wetzlar, D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammer EasyPhor Medi	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Histo Kit	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH + Co KG, Sondheim/Rhön, D
Histoembeeder 1160	Leica Biosystem Nussloch GmbH, Nussloch D

---

Magnetrührer	Janke & Kunkel GmbH + Co. KG, IKA-Werke, Staufen, D
Mighty Small SE245 Dual Gel Caster	Hoefer® Inc., Holliston, MA, USA
Pumpe Thermonix 1419	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Rotationsmikrotom RM2125	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
Schüttler KL2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
T Personal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, D
Tank-Blot-Apparatur Mini Trans Blot®	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tissueflotation Bath TFB 45.000	Medite Medizintechnik, Burgdorf, D
Transilluminator 312nm	Biostep GmbH, Jahnsdorf, D
Ultra Turrax®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
UV-Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Vortex-Mixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Instruments, Berverly, MA, USA

#### A.4 Software

BioEdit	Tom Hall, Ibis Biosciences/Abbott Laboratories, Carlsbad, CA, USA <a href="http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>
BLAST	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>



CFX Manager™	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Image Manager IM1000 V.1.20	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Microsoft® Office:mac 2011	Microsoft Corporation, Remond, Washington, USA
Oligo Explorer 1.1.0	Teemu Kuulasmaa, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland
UTHSCSA Image Tool (IT) Version 3.0	University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA <a href="http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html">http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc .html</a>

## A.5 Puffer und Lösungen

### A.5.1 Proteinextraktion und Western-Blot

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
ABC-Lösung	ICC-Puffer	2,5 ml	s.u.
	Lösung A	45 µl	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	Lösung B	45 µl	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
10% APS	APS		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Aqua bidest.	1 ml	

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Avidin-Lösung	Avidin	2 Tr.	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA
	PBS	5 ml	s.u.

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Biotin-Lösung	Biotin	2 Tr.	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA
	PBS	5 ml	s.u.

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Blockinpuffer	Milchpulver	5 g	J. M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG – Milchwerk, Obergünzburg, D
	PBS-Puffer	100 ml	Siehe unten
	2% Thimerosal	1 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
BSA-Blockingpuffer	PBS-Puffer	100 ml	s.u.
	BSA	1,43 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Triton®X-100	30 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Elektrodenpuffer	Glycin	144 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	SDS	10 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	Tris-Base	30 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
NovaRED	Aqua bidest	5ml	
	Lsg. 1	3 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	Lsg. 2	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	Lsg. 3	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
PBS-Puffer Stammlösung	NaCl	41 g	Merck KgaA, Darmstadt, D
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	11 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,75 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	Aqua bidest.	1000 ml	
Gebrauchslösung	Stammlösung	200 ml	
	Aqua bidest.	1000 ml	

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
PBST-Puffer	Tween®20	1 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	PBS- Gebrauchslsg.	1000 ml	s.o.

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Ponceau- Stammlösung	Ponceau-S	2 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Trichloressigsäure	30 g	Merck Millipore, Merck KgaA, Darmstadt, D
	Sulfosalicylsäure	30 g	Fluka™ Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Arbeitslösung	Stammlösung	1 ml	s.o.
	Aqua bidest.	9 ml	

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Probenpuffer Loading Dye	Sammelgelpuffer	1,75 ml	s.u.
	Glycerin	1,5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	10% SDS	5,0 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	β- Mercaptoethanol	0,5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Bromphenolblau	1,25 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Proteinase- Inhibitor-Cocktail	1 x PBS	10 ml	s.o.
	Complete Mini	1 Tbl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Gel	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Sammelgel 5% Acrylamid	Rotiphorese® Gel 30	0,417 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Sammelgelpuffer	0,313 ml	s.u.
	Aqua bidest.	1,731 ml	
	10% SDS- Stammlösung	25 µl	s.u.
	10% APS	13 µl	s.u.
	TEMED	3 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Sammelgelpuffer	Tris	7,88 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
10% SDS Stammlösung	SDS	10 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	Aqua bidest.	100 ml	

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Transferpuffer	Tris-Base	3,03 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Glycin	14,4 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Methanol	100 ml	Merck KgaA, Darmstadt, D
	Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Gel	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Trenngel 7,5% Acrylamid	Rotiphorese® Gel 30	1,875 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Trenngelpuffer	2,813 ml	s.u.
	Aqua bidest.	2,675 ml	s.u.
	10% SDS Stammlösung	75 µl	s.u.
	10% APS	60 µl	s.u.
	TEMED	6 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Trenngelpuffer	Tris	23,64 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Aqua bidest.	ad 100 ml	

## A.5.2 Immunhistochemie

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
ABC-Lösung	ICC-Puffer	2,5 ml	s.u.
	Lösung A	45 µl	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	Lösung B	45 µl	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Citratpuffer			
Stammlösung A	$C_6H_8O_7 \times H_2O$ + Aqua bidest.	10,505 g 500 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D
Stammlösung B	$C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ + Aqua bidest.	29,41 g 1000 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Gebrauchslösung	Stammlösung A	9 ml	s.o.
	Stammlösung B	41 ml	

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
96%-iges Ethanol	Ethanol	8 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Aqua bidest.	192 ml	

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
70%-iges Ethanol	Ethanol	60 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	Aqua bidest	140 ml	

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Hämatoxylin (1:1)	Hämatoxylin- Lösung	100 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D
	Auqua bidest.	100 ml	

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
ICC Puffer	Aqua bidest.	2000 ml	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,4 g	Merck KgaA, Darmstadt, D
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	Kcl	0,4 g	Merck KgaA, Darmstadt, D
	NaCl	16,0 g	Merck KgaA, Darmstadt, D
	Hcl	ad pH 7,2-7,4	Fluka™ Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	Triton®X-100	6 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
NovaRED	Aqua bidest.	5 ml	
	Lsg. 1	3 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	Lsg. 2	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	Lsg. 3	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 Tr.	Vector® Laboratories, Inc; Burlingame, CA USA



Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
1M Tris-HCL-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan	121,14 g	Merck KGaA, Darmstadt, D
	Aqua bidest	800 ml	
	Hcl	ad pH 7,6	Fluka™ Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
	Aqua bidest	ad 1000 ml	
Gebrauchslösung	1M Tris-HCL-Puffer	100 ml	s.o.
	Aqua bidest	900 ml	
	Triton®X-100	3 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
3%-iges Wasserstoffperoxid in Methanol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	20 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D
	Methanol	200 ml	Merck KGaA, Darmstadt, D

### A.5.3 RNA-Isolierung und PCR

Gel	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Agarose-Gel	Agarose	1,82 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	TAE-Puffer	91 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
	GelGreen	9,1 µl	Biotium, Inc. Hayward, CA, USA

B. Literaturverzeichnis

- Al-Attar, L., Noel, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M.G., Burgoyne, P.S., Josso, N. and Rey, R. 1997. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 1335-43.
- Amann, R.P. and Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of animal science*, 57 Suppl 2, 380-403.
- Anderson, J.M. and Van Itallie, C.M. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal of Physiology*, 269, G467-75.
- Ando-Akatsuka, Y., Saitou, M., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibara, A., Itoh, M., Yonemura, S., Furuse, M. and Tsukita, S. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *Journal of Cell Biology*, 133, 43-7.
- Anthony, C.T., Kovacs, W.J. and Skinner, M.K. 1989. Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology*, 125, 2628-35.
- Aravindan, G.R., Gopalakrishnan, K., Ravindranath, N. and Moudgal, N.R. 1993. Effect of altering endogenous gonadotrophin concentrations on the kinetics of testicular germ cell turnover in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Journal of Endocrinol*, 137, 485-95.
- Archard, H.O. and Denys, F.R. 1979. Development of annular gap junctions in guinea pig epithelia. *Journal of Oral Pathology*, 8, 187-97.
- Armstrong, S.P., Caunt, C.J., Finch, A.R. and McArdle, C.A. 2011. Using automated imaging to interrogate gonadotrophin-releasing hormone receptor trafficking and function. *Molecular and cellular endocrinology*, 331, 194-204.
- Aumüller, G., Schulze, C. and Viebahn, C. 1992. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microscopy Research & Technique*, 20, 50-72.
- Aumüller, G., Steinbrück, M., Krause, W. and Wagner, H.J. 1988. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anat Embryol (Berl)*, 178, 129-36.
- Aurich, C. and Töpfer-Petersen, E. 2005. Reproduktion bei männlichen Haussäugetieren. In: Engelhardt, W.v. and Breves, G. (eds.) *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag.
- Aurich, C. and Töpfer-Petersen, E. 2009. Reproduktion bei männlichen Hausäugetiere. In: Engelhardt, W.v. and Breves, G. (eds.) *Physiologie der Haustiere*. Enke.
- Balda, M.S., Flores-Maldonado, C., Cereijido, M. and Matter, K. 2000. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78, 85-96.
- Bamforth, S.D., Kniessel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B. and Risau, W. 1999. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *Journal of Cell Science*, 112, 1879-88.
- Bascom, K.F. and Osterud, H.L. 1925. Quantitative studies of the testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anatomical Record*, 31, 159-169.
- Batias, C., Siffroi, J.P., Fenichel, P., Pointis, G. and Segretain, D. 2000. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48, 793-805.

- Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C. and Saffitz, J.E. 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circulation Research*, 83, 629-35.
- Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J. and Knobil, E. 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalmic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 202, 631-3.
- Benedetti, E.L. and Emmelot, P. 1965. Electron microscopic observations on negatively stained plasma membranes isolated from rat liver. *Journal of Cell Biology*, 26, 299-305.
- Bennett, H.P. and McMartin, C. 1978. Peptide hormones and their analogues: distribution, clearance from the circulation, and inactivation in vivo. *Pharmacological Reviews*, 30, 247-92.
- Bennett, M.V., Barrio, L.C., Bargiello, T.A., Spray, D.C., Hertzberg, E. and Saez, J.C. 1991. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*, 6, 305-20.
- Bergmann, M. 2005. [Spermatogenesis--physiology and pathophysiology]. *Der Urologe. Ausg. A*, 44, 1131-2, 1134-8.
- Bergmann, M. 2006. Physiology of Spermatogenesis. In: Schill, W.-B., Comhaire, F.H. and Hargreave, T.B. (eds.) *Andrology for the Clinician*. Berlin: Springer.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F. and Fischbeck, K.H. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, 262, 2039-42.
- Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D. and Hecht, G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*, 52, 439-51.
- Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K. and Harris, A.L. 1998. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 2808-16.
- Beyer, E.C., Kistler, J., Paul, D.L. and Goodenough, D.A. 1989. Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *Journal of Cell Biology*, 108, 595-605.
- Beyer, E.C., Paul, D.L. and Goodenough, D.A. 1987. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *Journal of Cell Biology*, 105, 2621-9.
- Beyer, E.C., Paul, D.L. and Goodenough, D.A. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *Journal of Membrane Biology*, 116, 187-94.
- Bourguignon, J.P., Gerard, A., Debougnoux, G., Rose, J. and Franchimont, P. 1987. Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the rat hypothalamus in vitro: calcium and glucose dependency and inhibition by superactive GnRH analogs. *Endocrinology*, 121, 993-9.
- Bravo-Moreno, J.F., Diaz-Sanchez, V., Montoya-Flores, J.G., Lamoyi, E., Saez, J.C. and Perez-Armendariz, E.M. 2001. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anatomical Record*, 264, 13-24.
- Brehm, R., Rey, R., Kliesch, S., Steger, K., Marks, A. and Bergmann, M. 2006. Mitotic activity of Sertoli cells in adult human testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. *Anatomy & Embryology (Berl)*, 211, 223-36.
- Brehm, R. and Steger, K. 2005. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Advances in Anatomy, Embryology & Cell Biology*, 181, 1-93.

- Brehm, R., Zeiler, M., Ruttinger, C., Herde, K., Kibschull, M., Winterhager, E., Willecke, K., Guillou, F., Lecureuil, C., Steger, K., Konrad, L., Biermann, K., Failing, K. and Bergmann, M. 2007. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *The American journal of pathology*, 171, 19-31.
- Bremner, W.J., Millar, M.R., Sharpe, R.M. and Saunders, P.T. 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, 135, 1227-34.
- Brown, H.H. 1885. On Spermatogenesis in the Rat. *Quarterly of Microscopical Science*, 25, 343-370.
- Bruzzone, R., White, T.W. and Paul, D.L. 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, 238, 1-27.
- Büsges, F. 2003. *Immunhistologischer Nachweis von Leukozyten, MHC-II Antigen und Gefäßendothelien am Corpus luteum der Hündin im Verlauf des Zyklus*. Dr. med. vet, Justus Liebig Universität.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-22.
- Buxton, R.S., Cowin, P., Franke, W.W., Garrod, D.R., Green, K.J., King, I.A., Koch, P.J., Magee, A.I., Rees, D.A. and Stanley, J.R. 1993. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *Journal of Cell Biology*, 121, 481-3.
- Buzzard, J.J., Wreford, N.G. and Morrison, J.R. 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology*, 144, 3722-31.
- Byrne, B., Klahn, S., Taylor, P.L. and Eidne, K.A. 1998. Functional analysis of GnRH receptor ligand binding using biotinylated GnRH derivatives. *Mol Cell Endocrinol*, 144, 11-9.
- Calero, G., Kanemitsu, M., Taffet, S.M., Lau, A.F. and Delmar, M. 1998. A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circulation Research*, 82, 929-35.
- Carette, D., Weider, K., Gilleron, J., Giese, S., Dompierre, J., Bergmann, M., Brehm, R., Denizot, J.P., Segretain, D. and Pointis, G. 2010. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Developmental biology*, 346, 54-67.
- Carmel, P.W., Araki, S. and Ferin, M. 1976. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology*, 99, 243-8.
- Cascio, M., Gogol, E. and Wallace, B.A. 1990. The secondary structure of gap junctions. Influence of isolation methods and proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 2358-64.
- Chalcroft, J.P. and Bullivant, S. 1970. An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture. *Journal of Cell Biology*, 47, 49-60.
- Chemes, H. 1986. The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology*, 119, 1673-81.

- Cheng, C.Y. and Mruk, D.D. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews*, 82, 825-74.
- Cheng, C.Y. and Mruk, D.D. 2009. An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*, 44, 245-63.
- Cheng, C.Y. and Mruk, D.D. 2010. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 6, 380-95.
- Chung, N.P. and Cheng, C.Y. 2001. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*, 142, 1878-88.
- Chung, N.P., Mruk, D., Mo, M.Y., Lee, W.M. and Cheng, C.Y. 2001. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. *Biology of Reproduction*, 65, 1340-51.
- Clarke, I.J. and Cummins, J.T. 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111, 1737-9.
- Claude, P. 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *Journal of Membrane Biology*, 39, 219-32.
- Claude, P. and Goodenough, D.A. 1973. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *Journal of Cell Biology*, 58, 390-400.
- Clermont, Y. 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112, 35-51.
- Clermont, Y. 1966. Renewal of spermatogonia in man. *American Journal of Anatomy*, 118, 509-24.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 52, 198-236.
- Connell, C.J. 1980. Blood-testis barrier formation and the initiation of meiosis in the dog. In: Steinberger, A. and Steinberger, E. (eds.) *Testicular development, structure and function*. Raven Press New York.
- Connell, C.J. and Christensen, K. 1975. The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. *Biology of Reproduction*, 12, 368-82.
- Cooke, P.S., Holsberger, D.R. and Franca, L.R. 2005. Thyroid Hormone Regulation of Sertoli Cell Development. In: Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (eds.) *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press.
- Coy, D.H., Vilchez-Martinez, J.A., Coy, E.J. and Schally, A.V. 1976. Analogs of luteinizing hormone-releasing hormone with increased biological activity produced by D-amino acid substitutions in position 6. *Journal of Medicinal Chemistry*, 19, 423-5.
- Cruciani, V. and Mikalsen, S.O. 2005. The connexin gene family in mammals. *Biological Chemistry*, 386, 325-32.
- Cyr, D.G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J.M. and Laird, D.W. 1999. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology*, 140, 3815-25.

- Dahl, G., Levine, E., Rabadan-Diehl, C. and Werner, R. 1991. Cell/cell channel formation involves disulfide exchange. *European Journal of Biochemistry*, 197, 141-4.
- Dahl, G., Werner, R., Levine, E. and Rabadan-Diehl, C. 1992. Mutational analysis of gap junction formation. *Biophysical journal*, 62, 172-80; discussion 180-2.
- Danesh-Meyer, H.V. and Green, C.R. 2008. Focus on molecules: connexin 43--mind the gap. *Experimental eye research*, 87, 494-5.
- Darrow, B.J., Laing, J.G., Lampe, P.D., Saffitz, J.E. and Beyer, E.C. 1995. Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, 76, 381-7.
- Decrouy, X., Gasc, J.M., Pointis, G. and Segretain, D. 2004. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 200, 146-54.
- Defamie, N., Berthaut, I., Mograbi, B., Chevallier, D., Dadoune, J.P., Fenichel, P., Segretain, D. and Pointis, G. 2003. Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Laboratory Investigation*, 83, 449-56.
- Delmar, M., Coombs, W., Sorgen, P., Duffy, H.S. and Taffet, S.M. 2004. Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovascular research*, 62, 268-75.
- DePalatis, L., Moore, J. and Falvo, R.E. 1978. Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. *Journal of Reproduction & Fertility*, 52, 201-7.
- Dhein, S. 1998. Gap-Junction-Kanäle und zelluläre Kommunikation. Neue Erkenntnisse zur Bedeutung in der Medizin. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 123, 912-7.
- Dhein, S. 2002. Peptides acting at gap junctions. *Peptides*, 23, 1701-9.
- Diamond, J.M. 1977. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*, 20, 10-8.
- Döcke, F. 1994. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*, Gustav Fischer Verlag.
- Dubé, D., Assaf, A., Pelletier, G. and Labrie, F. 1987. Morphological study of the effects of an GnRH agonist on the canine testis after 4 months of treatment and recovery. *Acta Endocrinologica*, 116, 413-7.
- Dym, M. and Cavicchia, J.C. 1977. Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. *Biology of Reproduction*, 17, 390-403.
- Dym, M. and Clermont, Y. 1970. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, 128, 265-82.
- Dym, M. and Fawcett, D.W. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 3, 308-26.
- Ebner, V.v. 1888. Zur Spermatogenese bei den Säugetieren. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 31, 236-292.
- Eiberger, J., Degen, J., Romualdi, A., Deutsch, U., Willecke, K. and Sohl, G. 2001. Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell communication & adhesion*, 8, 163-5.
- Ek, J.F., Delmar, M., Perzova, R. and Taffet, S.M. 1994. Role of histidine 95 on pH gating of the cardiac gap junction protein connexin43. *Circulation Research*, 74, 1058-64.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hulser, D.F. and Willecke, K. 1995. Specific permeability and selective

- p>formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells.
- Journal of Cell Biology*
- , 129, 805-17.
- Falk, M.M., Kumar, N.M. and Gilula, N.B. 1994. Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *Journal of Cell Biology*, 127, 343-55.
- Fallon, R.F. and Goodenough, D.A. 1981. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *Journal of Cell Biology*, 90, 521-6.
- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *Journal of Cell Biology*, 17, 375-412.
- Fawcett, D.W., Ito, S. and Slautterback, D. 1959. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *Journal of Biophysical & Biochemical Cytology*, 5, 453-60.
- Feldman, G.J., Mullin, J.M. and Ryan, M.P. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 883-917.
- Ferguson, S.S. and Caron, M.G. 1998. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9, 119-27.
- Fijak, M. and Meinhardt, A. 2006. The testis in immune privilege. *Immunological Reviews*, 213, 66-81.
- Finch, A.R., Caunt, C.J., Armstrong, S.P. and McArdle, C.A. 2009. Agonist-induced internalization and downregulation of gonadotropin-releasing hormone receptors. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297, C591-600.
- Foote, R.H., Swierstra, E.E. and Hunt, W.L. 1972. Spermatogenesis in the dog. *Anat Rec*, 173, 341-51.
- Franca, L.R., Silva, V.A., Jr., Chiarini-Garcia, H., Garcia, S.K. and Debeljuk, L. 2000. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, 63, 1629-36.
- Franke, W.W., Grund, C. and Schmid, E. 1979. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *European Journal of Cell Biology*, 19, 269-75.
- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K. 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 5034-8.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *Journal of Cell Biology*, 141, 1539-50.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 123, 1777-88.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 127, 1617-26.
- Furuse, M., Sasaki, H. and Tsukita, S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *Journal of Cell Biology*, 147, 891-903.
- Furuse, M. and Tsukita, S. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology*, 16, 181-8.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 107-44.

- Gasse, H. 2004. Männliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia masculina. In: Nickel, R., Schummer, A. and Seiferle, E. (eds.) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II Eingeweide*. Stuttgart: Parey Verlag.
- Gentil, M. 2012. Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese nach Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden: Expression von StAR-Protein, P450scc und P450c17. Dr. med. vet., Justus Liebig Universität.
- George, C.H., Kendall, J.M. and Evans, W.H. 1999. Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 8678-85.
- Giepman, B.N. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular research*, 62, 233-45.
- Gilula, N.B., Fawcett, D.W. and Aoki, A. 1976. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Developmental biology*, 50, 142-68.
- Gimlich, R.L., Kumar, N.M. and Gilula, N.B. 1990. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *Journal of Cell Biology*, 110, 597-605.
- Goericke-Pesch, S., Ludwig, C. and Hoffmann, B. 2011. Development of Semen Quality Following reversible Downregulation of Testicular Function in male Dogs with a GnRH Agonist Implant. *Reproduction in Domestic Animals*.
- Goericke-Pesch, S., Spang, A., Schulz, M., Ozalp, G., Bergmann, M., Ludwig, C. and Hoffmann, B. 2009. Recrudescence of spermatogenesis in the dog following downregulation using a slow release GnRH agonist implant. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2, 302-8.
- Goericke-Pesch, S., Wilhelm, E. and Hoffmann, B. 2010a. Hormonelle Downregulation der Hodenfunktion bei Rüde und Kater- eine retrospektive Studie. *Der Praktische Tierarzt*, 91, 563-570.
- Goericke-Pesch, S., Wilhelm, E., Ludwig, C., Desmoulins, P.O., Driancourt, M.A. and Hoffmann, B. 2010b. Evaluation of the clinical efficacy of Gonazon implants in the treatment of reproductive pathologies, behavioral problems, and suppression of reproductive function in the male dog. *Theriogenology*, 73, 920-6.
- Goldberg, G.S., Lampe, P.D. and Nicholson, B.J. 1999. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nature Cell Biology*, 1, 457-9.
- Goldberg, G.S., Moreno, A.P. and Lampe, P.D. 2002. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 36725-30.
- Goldberg, G.S., Valiunas, V. and Brink, P.R. 2004. Selective permeability of gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1662, 96-101.
- Goliger, J.A. and Paul, D.L. 1994. Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37, and Cx43 in developing and mature rat epidermis. *Developmental Dynamics*, 200, 1-13.
- Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J. and Gilula, N.B. 1997. Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell*, 91, 833-43.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A. and Avila-Flores, A. 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11, 315-24.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. and Jaramillo, B.E. 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 81, 1-44.



- Goodenough, D.A. 1975. The structure of cell membranes involved in intercellular communication. *American Journal of Clinical Pathology*, 63, 636-45.
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A. and Paul, D.L. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 475-502.
- Gow, A., Southwood, C.M., Li, J.S., Pariali, M., Riordan, G.P., Brodie, S.E., Danias, J., Bronstein, J.M., Kachar, B. and Lazzarini, R.A. 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell*, 99, 649-59.
- Grino, P.B., Griffin, J.E. and Wilson, J.D. 1990. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 126, 1165-72.
- Griswold, M.D., Solari, A., Tung, P.S. and Fritz, I.B. 1977. Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of immature rats. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 7, 151-65.
- Günzel-Apel, A.-R., Brinckmann, H.-G. and Hoppen, H.O. 1990. Dynamik der LH- und testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen. *Reproduction in Domestic Animals*, 25, 78-86.
- Gye, M.C. 2004. Expression of occludin in canine testis and epididymis. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 43-7.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S. 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 455-61.
- Hammond, G.L. 2011. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biology of Reproduction*, 85, 431-41.
- Handelsman, D.J. and Swerdloff, R.S. 1986. Pharmacokinetics of gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Endocrine Reviews*, 7, 95-105.
- Harhaj, N.S. and Antonetti, D.A. 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 1206-37.
- Harris, A.L. 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 34, 325-472.
- Hartsock, A. and Nelson, W.J. 2008. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 660-9.
- Heckert, L.L. and Griswold, M.D. 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 129-48.
- Heding, A., Vrecl, M., Bogerd, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P.L. and Eidne, K.A. 1998. Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11472-7.
- Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Sadowska, J. and Bilinska, B. 2007. Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. *Equine Veterinary Journal*, 39, 122-7.
- Hellani, A., Ji, J., Mauduit, C., Deschildre, C., Tabone, E. and Benahmed, M. 2000. Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis. *Endocrinology*, 141, 3012-9.

- Heller, C.G. and Clermont, Y. 1963. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*, 140, 184-6.
- Herbst, K.L. 2003. Gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Current Opinion in Pharmacology*, 3, 660-6.
- Hill, C.M., Anway, M.D., Zirkin, B.R. and Brown, T.R. 2004. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 71, 1348-58.
- Hoffmann, B. 2003. *Andrologie Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung*, Lehmanns Media.
- Holstein, A.F., Schulze, W. and Davidoff, M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 1, 107.
- Holton, J.L., Kenny, T.P., Legan, P.K., Collins, J.E., Keen, J.N., Sharma, R. and Garrod, D.R. 1990. Desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins) show N-terminal similarity to calcium-dependent cell-cell adhesion molecules. *Journal of Cell Science*, 97, 239-46.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29, 577-80.
- Huckins, C. 1978. Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes. *American Journal of Anatomy*, 153, 97-121.
- Hutson, J.M., Hasthorpe, S. and Heyns, C.F. 1997. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, 18, 259-80.
- Ibach, B., Weissbach, L. and Hilscher, B. 1976. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog. *Andrologia*, 8, 297-307.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *Journal of Cell Biology*, 147, 1351-63.
- Johnson, L. 1995. Efficiency of spermatogenesis. *Microscopy Research & Technique*, 32, 385-422.
- Johnson, L., Zane, R.S., Petty, C.S. and Neaves, W.B. 1984. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biology of Reproduction*, 31, 785-95.
- Johnson, M.H. 1970a. Changes in the blood-testis barrier of the guinea-pig in relation to histological damage following iso-immunization with testis. *Journal of Reproduction & Fertility*, 22, 119-27.
- Johnson, M.H. 1970b. An immunological barrier in the guinea-pig testis. *Journal of Pathology*, 101, 129-39.
- Johnston, D.S., Russell, L.D., Friel, P.J. and Griswold, M.D. 2001. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*, 142, 2405-8.
- Josso, N. 1995. Paediatric applications of anti-mullerian hormone research. 1992 Andrea Prader Lecture. *Hormone Research*, 43, 243-8.
- Josso, N., di Clemente, N. and Gouedard, L. 2001. Anti-Mullerian hormone and its receptors. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 179, 25-32.
- Josso, N., Lamarre, I., Picard, J.Y., Berta, P., Davies, N., Morichon, N., Peschanski, M. and Jeny, R. 1993. Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Human Development*, 33, 91-9.

- Josso, N., Legeai, L., Forest, M.G., Chaussain, J.L. and Brauner, R. 1990. An enzyme linked immunoassay for anti-mullerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70, 23-7.
- Junaidi, A., Williamson, P.E., Cummins, J.M., Martin, G.B., Blackberry, M.A. and Trigg, T.E. 2003. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction, Fertility, & Development*, 15, 317-22.
- Junaidi, A., Williamson, P.E., Martin, G.B., Stanton, P.G., Blackberry, M.A., Cummins, J.M. and Trigg, T.E. 2007. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reproduction, Fertility, & Development*, 19, 891-8.
- Junaidi, A., Williamson, P.E., Trigg, T.E., Cummins, J.M. and Martin, G.B. 2009. Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 757-63.
- Juneja, S.C., Barr, K.J., Enders, G.C. and Kidder, G.M. 1999. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biology of Reproduction*, 60, 1263-70.
- Kahiri, C.N., Khalil, M.W., Tekpetey, F. and Kidder, G.M. 2006. Leydig cell function in mice lacking connexin43. *Reproduction*, 132, 607-16.
- Kaitu'u-Lino, T.J., Sluka, P., Foo, C.F. and Stanton, P.G. 2007. Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro. *Reproduction*, 133, 1169-79.
- Kamibayashi, Y., Oyamada, M., Oyamada, Y. and Mori, M. 1993. Expression of gap junction proteins connexin 26 and 43 is modulated during differentiation of keratinocytes in newborn mouse epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 101, 773-8.
- Katsumoto, T., Mitsushima, A. and Kurimura, T. 1990. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biology of the Cell*, 68, 139-46.
- Keeney, D.S. and Ewing, L.L. 1990. Effects of hypophysectomy and alterations in spermatogenic function on Leydig cell volume, number, and proliferation in adult rats. *Journal of Andrology*, 11, 367-78.
- Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F. and Leigh, I.M. 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387, 80-3.
- Kerr, J.B. 1988. A light microscopic and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. *Anatomy & Embryology (Berl)*, 177, 341-8.
- Key, M. 2009. Immunohistochemistry staining methods. In: Key, M. (ed.) *Pathology - Education Guide - Immunohistochemical Staining Methods*. 5 ed.: Dako, Carpinteria.
- Kissinger, C., Skinner, M.K. and Griswold, M.D. 1982. Analysis of Sertoli cell-secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biology of Reproduction*, 27, 233-40.
- Kleine, B. and Rossmannith, W.G. 2009. *Hormone und Hormonsystem Lehrbuch der Endokrinologie*, Springer Berlin Heidelberg.

- Kluin, P.M., Kramer, M.F. and de Rooij, D.G. 1984. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl)*, 169, 73-8.
- Knol, B.W., Dieleman, S.J., Bevers, M.M. and van den Brom, W.E. 1993. GnRH in the male dog: dose-response relationships with LH and testosterone. *Journal of Reproduction & Fertility*, 98, 159-61.
- Koch, A., Hoppen, H.O., Dieleman, S.J., Kooistra, H.S. and Gunzel-Apel, A.R. 2006. Effects of the dopamine agonist cabergoline on the pulsatile and TRH-induced secretion of prolactin, LH, and testosterone in male beagle dogs. *Theriogenology*, 65, 1666-77.
- Koch, P.J., Walsh, M.J., Schmelz, M., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R. and Franke, W.W. 1990. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *European Journal of Cell Biology*, 53, 1-12.
- Komljenovic, D., Sandhoff, R., Teigler, A., Heid, H., Just, W.W. and Gorgas, K. 2009. Disruption of blood-testis barrier dynamics in ether-lipid-deficient mice. *Cell & Tissue Research*, 337, 281-99.
- König, H.E. and Liebich, H.-G. 2005. Endokrine Drüsen (Glandulae endocrinae). In: König, H.E. and Liebich, H.-G. (eds.) *Anatomie der Haussäugetiere*. Schattauer Stuttgart, New York.
- Koopman, P. 1995. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. *Reproduction, Fertility, & Development*, 7, 713-22.
- Kormano, M. 1967. Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the postnatal rat. *Histochemie*, 9, 327-38.
- Koval, M., Harley, J.E., Hick, E. and Steinberg, T.H. 1997. Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *Journal of Cell Biology*, 137, 847-57.
- Kubota, K., Furuse, M., Sasaki, H., Sonoda, N., Fujita, K., Nagafuchi, A. and Tsukita, S. 1999. Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Current Biology*, 9, 1035-8.
- Kumar, N.M. and Gilula, N.B. 1996. The gap junction communication channel. *Cell*, 84, 381-8.
- Laird, D.W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*, 394, 527-43.
- Laird, D.W., Castillo, M. and Kasprzak, L. 1995. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *Journal of Cell Biology*, 131, 1193-203.
- Laird, D.W., Puranam, K.L. and Revel, J.P. 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochemical Journal*, 273, 67-72.
- Lampe, P.D. and Lau, A.F. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 384, 205-15.
- Lampe, P.D. and Lau, A.F. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 1171-86.
- Larsen, W.J., Tung, H.N., Murray, S.A. and Swenson, C.A. 1979. Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. *Journal of Cell Biology*, 83, 576-87.
- Lauf, U., Giepmans, B.N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.C. and Falk, M.M. 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and

- accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10446-51.
- Lebelo, S.L. and van der Horst, G. 2010. The ultrastructure of the Sertoli cell of the vervet monkey, *Chlorocebus aethiops*. *Tissue & cell*, 42, 348-54.
- Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *American Journal of Anatomy*, 90, 167-215.
- Lebrun, J.J. and Vale, W.W. 1997. Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Molecular & Cellular Biology*, 17, 1682-91.
- Lee, M.M., Donahoe, P.K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G.B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R.A., Schoenfeld, D. and MacLaughlin, D.T. 1996. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 571-6.
- Lei, Z.M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X. and Rao, C.V. 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology*, 15, 184-200.
- Li, M.W., Mruk, D.D., Lee, W.M. and Cheng, C.Y. 2009. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 10213-8.
- Li, M.W., Mruk, D.D., Lee, W.M. and Cheng, C.Y. 2010. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 17998-8003.
- Li, M.W., Xia, W., Mruk, D.D., Wang, C.Q., Yan, H.H., Siu, M.K., Lui, W.Y., Lee, W.M. and Cheng, C.Y. 2006. Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *Journal of Endocrinology*, 190, 313-29.
- Liebich, H.-G. 1999. Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina). In: Liebich, H.-G., Böck, P., Budras, K.-D., Maierl, J. and Reese, S. (eds.) *Funktionelle Histologie der Haussägetiere 3. Auflage*. Stuttgart: Schattauer.
- Little, T.L., Beyer, E.C. and Duling, B.R. 1995. Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *American Journal of Physiology*, 268, H729-39.
- Liu, S., Taffet, S., Stoner, L., Delmar, M., Vallano, M.L. and Jalife, J. 1993. A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophysical journal*, 64, 1422-33.
- Loewenstein, W.R. 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiological Reviews*, 61, 829-913.
- Loewenstein, W.R. 1987. The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell*, 48, 725-6.
- Loveland, K.L. and Robertson, D.M. 2005. The transforming Growth Factor Beta Superfamily in Sertoli Cell Biology. In: Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (eds.) *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press.
- Lovell-Badge, R. 1993. Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 339, 159-64.
- Ludwig, C., Desmoulins, P.O., Driancourt, M.A., Goericke-Pesch, S. and Hoffmann, B. 2009. Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular

- function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azaglynafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial. *Theriogenology*, 71, 1037-45.
- Lyon, M.F., Glenister, P.H. and Lamoreux, M.L. 1975. Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature*, 258, 620-2.
- Mackay, S. 2000. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *International Review of Cytology*, 200, 47-99.
- Makowski, L., Caspar, D.L., Phillips, W.C. and Goodenough, D.A. 1977. Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *Journal of Cell Biology*, 74, 629-45.
- Marquart, K.H. 1977. So-called annular gap junctions in bone cells of normal mice. *Experientia*, 33, 270-2.
- Marshall, G.R., Jockenhovel, F., Ludecke, D. and Nieschlag, E. 1986. Maintenance of complete but quantitatively reduced spermatogenesis in hypophysectomized monkeys by testosterone alone. *Acta Endocrinologica*, 113, 424-31.
- Martin, P.E., Errington, R.J. and Evans, W.H. 2001. Gap junction assembly: multiple connexin fluorophores identify complex trafficking pathways. *Cell communication & adhesion*, 8, 243-8.
- Matter, K. and Balda, M.S. 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 225-36.
- Mazaud-Guittot, S., Meugnier, E., Pesenti, S., Wu, X., Vidal, H., Gow, A. and Le Magueresse-Battistoni, B. 2010. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biology of Reproduction*, 82, 202-13.
- McCabe, M.J., Allan, C.M., Foo, C.F., Nicholls, P.K., McTavish, K.J. and Stanton, P.G. 2012. Androgen initiates Sertoli cell tight junction formation in the hypogonadal (hpg) mouse. *Biology of Reproduction*, 87, 38.
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K. and Robertson, D.M. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 149-79.
- Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D. and Braun, R.E. 2005. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16696-700.
- Mese, G., Richard, G. and White, T.W. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 2516-24.
- Millar, R.P. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci*, 88, 5-28.
- Morales, C., Clermont, Y. and Nadler, N.J. 1986. Cyclic endocytic activity and kinetics of lysosomes in Sertoli cells of the rat: a morphometric analysis. *Biology of Reproduction*, 34, 207-18.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. and Tsukita, S. 1999a. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 511-6.
- Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M. and Tsukita, S. 1999b. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *Journal of Cell Biology*, 145, 579-88.

- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S. 1999c. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 147, 185-94.
- Moroi, S., Saitou, M., Fujimoto, K., Sakakibara, A., Furuse, M., Yoshida, O. and Tsukita, S. 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *American Journal of Physiology*, 274, C1708-17.
- Morrow, C.M., Mruk, D., Cheng, C.Y. and Hess, R.A. 2010. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 365, 1679-96.
- Morrow, C.M., Tyagi, G., Simon, L., Carnes, K., Murphy, K.M., Cooke, P.S., Hofmann, M.C. and Hess, R.A. 2009. Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets variant 5 and contributes to blood-testis barrier function. *Biology of Reproduction*, 81, 871-9.
- Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 25, 747-806.
- Musil, L.S. and Goodenough, D.A. 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 74, 1065-77.
- Nakhla, A.M., Mather, J.P., Janne, O.A. and Bardin, C.W. 1984. Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid, and epithelial cells: effects of time in culture and cell density. *Endocrinology*, 115, 121-8.
- Naor, Z. 1990. Signal transduction mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrine Reviews*, 11, 326-53.
- Naor, Z. 2009. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol*, 30, 10-29.
- Nieschlag, E., Simoni, M., Gromoll, J. and Weinbauer, G.F. 1999. Role of FSH in the regulation of spermatogenesis: clinical aspects. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 51, 139-46.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. and Tsukita, S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 161, 653-60.
- Oakberg, E.F. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*, 99, 507-16.
- Orth, J. and Christensen, A.K. 1978. Autoradiographic localization of specifically bound 125I-labeled follicle-stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis. *Endocrinology*, 103, 1944-51.
- Orth, J.M. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Record*, 203, 485-92.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L. and Lamperti, A.A. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122, 787-94.
- Oyamada, M., Oyamada, Y. and Takamatsu, T. 2005. Regulation of connexin expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1719, 6-23.

- Paranko, J., Kallajoki, M., Pelliniemi, L.J., Lehto, V.P. and Virtanen, I. 1986. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Developmental biology*, 117, 35-44.
- Pelletier, G. 2000. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histology & Histopathology*, 15, 1261-70.
- Pelletier, R.M. 1986. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *American Journal of Anatomy*, 175, 91-117.
- Pelletier, R.M. 1988. Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *American Journal of Anatomy*, 183, 68-102.
- Pelletier, R.M. 1995. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *Journal of Andrology*, 16, 400-9.
- Pelletier, R.M. and Byers, S.W. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microscopy Research & Technique*, 20, 3-33.
- Perey, B., Clermont, Y. and Leblond, C.P. 1961. The wave of seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy*, 108, 47-77.
- Perez-Armendariz, E.M., Lamoyi, E., Mason, J.I., Cisneros-Armas, D., Luu-The, V. and Bravo Moreno, J.F. 2001. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anatomical Record*, 264, 237-46.
- Perkins, G., Goodenough, D. and Sosinsky, G. 1997. Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophysical journal*, 72, 533-44.
- Petrusz, P. 2002. *Androgen-Binding Protein*.
- Pfaffl, M. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1, 92-95.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, e45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, e36.
- Pierce, J.G. and Parsons, T.F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 465-95.
- Pimstone, B., Epstein, S., Hamilton, S.M., LeRoith, D. and Hendricks, S. 1977. Metabolic clearance and plasma half disappearance time of exogenous gonadotropin releasing hormone in normal subjects and in patients with liver disease and chronic renal failure. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 44, 356-60.
- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O. and Willecke, K. 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Current Biology*, 10, 1083-91.
- Powell, D.W. 1981. Barrier function of epithelia. *American Journal of Physiology*, 241, G275-88.
- Rahner, C., Mitic, L.L. and Anderson, J.M. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120, 411-22.



- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M. and Rossant, J. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*, 267, 1831-4.
- Regadera, J., Martinez-Garcia, F., Gonzalez-Peramato, P., Serrano, A., Nistal, M. and Suarez-Quian, C. 2001. Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 413-21.
- Revel, J.P. and Karnovsky, M.J. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *Journal of Cell Biology*, 33, C7-C12.
- Rey, R., Mebarki, F., Forest, M.G., Mowszowicz, I., Cate, R.L., Morel, Y., Chaussain, J.L. and Josso, N. 1994. Anti-mullerian hormone in children with androgen insensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79, 960-4.
- Riesenbeck, A., Klein, R. and Hoffmann, B. 2002. Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden. *Der Praktische Tierarzt* 83, 512-520.
- Risek, B., Guthrie, S., Kumar, N. and Gilula, N.B. 1990. Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *Journal of Cell Biology*, 110, 269-82.
- Risley, M.S. 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biology of Reproduction*, 62, 748-54.
- Risley, M.S., Tan, I.P., Roy, C. and Saez, J.C. 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci*, 103, 81-96.
- Roberts, K.P. and Zirkin, B.R. 1991. Androgen regulation of spermatogenesis in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 637, 90-106.
- Rodriguez-Boulau, E. and Nelson, W.J. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*, 245, 718-25.
- Rogatsch, H., Jezek, D., Hittmair, A., Mikuz, G. and Feichtinger, H. 1996. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Archiv*, 427, 497-502.
- Roosen-Runge, E.C. and Barlow, F.D. 1953. Quantitative studies on human spermatogenesis. I. Spermatogonia. *American Journal of Anatomy*, 93, 143-69.
- Roscoe, W.A., Barr, K.J., Mhawi, A.A., Pomerantz, D.K. and Kidder, G.M. 2001. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biology of Reproduction*, 65, 829-38.
- Rowley, M.J., Berlin, J.D. and Heller, C.G. 1971. The ultrastructure of four types of human spermatogonia. *Ptschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomielexus*, 112, 139-57.
- Russell, L. 1977. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, 148, 313-28.
- Russell, L. and Frank, B. 1978. Characterization of rat spermatocytes after plastic embedding. *Archives of Andrology*, 1, 5-18.
- Russell, L.D. 1978. The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. *Anatomical Record*, 190, 99-111.
- Russell, L.D. and Clermont, Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anatomical Record*, 187, 347-66.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. 1990a. The Classification and Timing of Spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlin, R.A.,

- Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. (eds.) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. 1990b. *Histological and Histopathological Evaluation of the testis*, Cache River Press.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. 1990c. Mammalian Spermatogenesis. In: Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg, E.D. (eds.) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. St. Louis: Cache River Press.
- Russell, L.D. and Peterson, R.N. 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International Review of Cytology*, 94, 177-211.
- Russell, L.D., Ren, H.P., Sinha Hikim, I., Schulze, W. and Sinha Hikim, A.P. 1990d. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy*, 188, 21-30.
- Russell, L.D., Tallon-Doran, M., Weber, J.E., Wong, V. and Peterson, R.N. 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: III. A study of specific cellular relationships. *American Journal of Anatomy*, 167, 181-92.
- Rüttinger, C., Bergmann, M., Fink, L., Pesch, S., Seitz, K., Trautmann, A., Steger, K., Konrad, L. and Brehm, R. 2008. Expression of connexin 43 in normal canine testes and canine testicular tumors. *Histochemistry and cell biology*, 130, 537-48.
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D. and Beyer, E.C. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological Reviews*, 83, 1359-400.
- Saez, J.C., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Spray, D.C., Hertzberg, E.L., Greengard, P. and Bennett, M.V. 1990. Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *European Journal of Biochemistry*, 192, 263-73.
- Saez, J.C., Retamal, M.A., Basilio, D., Bukauskas, F.F. and Bennett, M.V. 2005. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711, 215-24.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 141, 397-408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 4131-42.
- Sanford, J.L., Edwards, J.D., Mays, T.A., Gong, B., Merriam, A.P. and Rafael-Fortney, J.A. 2005. Claudin-5 localizes to the lateral membranes of cardiomyocytes and is altered in utrophin/dystrophin-deficient cardiomyopathic mice. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 38, 323-32.
- Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M., Debeljuk, L. and White, W.F. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, 173, 1036-8.
- Schlatt, S., Rosiepen, G., Weinbauer, G.F., Rolf, C., Brook, P.F. and Nieschlag, E. 1999. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Human Reproduction*, 14, 144-50.

- Schneeberger, E.E. and Lynch, R.D. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *American Journal of Physiology*, 262, L647-61.
- Schulzke, J.D. and Fromm, M. 2009. Tight junctions: molecular structure meets function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 1-6.
- Segretain, D. and Falk, M.M. 2004. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1662, 3-21.
- Seki, K. and Komuro, T. 2002. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/Wv mutant mice. *Anatomy & Embryology (Berl)*, 206, 57-65.
- Setchell, B.P. 1967. The blood-testicular fluid barrier in sheep. *Journal of Physiology (Lond)*, 189, 63P-65P.
- Setchell, B.P., Voglmayr, J.K. and Waites, G.M. 1969. A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph. *Journal of Physiology (Lond)*, 200, 73-85.
- Shan, L.X., Bardin, C.W. and Hardy, M.P. 1997. Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology*, 138, 1259-66.
- Sharpe, R.M. 2005. Sertoli Cell Endocrinology and Signal Transduction: Androgen Regulation. In: Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (eds.) *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press.
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. and Fisher, J.S. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769-84.
- Silber, S.J. 2000. Evaluation and treatment of male infertility. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 43, 854-88.
- Simoni, M., Gromoll, J. and Nieschlag, E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 18, 739-73.
- Singh, J. and Handelsman, D.J. 1996. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Journal of Endocrinology*, 151, 37-48.
- Sinha Hikim, A.P., Amador, A.G., Klemcke, H.G., Bartke, A. and Russell, L.D. 1989. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology*, 125, 1829-1843.
- Skinner, M.K. 2005. Sertoli Cell Secreted Regulatory Factors. In: Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (eds.) *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press.
- Smith, P.E. 1930. Hypophysectomy and Replacement Therapy in the Rat. *American Journal of Anatomy*, 45, 205-273.
- Soares, J.M., Avelar, G.F. and Franca, L.R. 2009. The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). *Journal of Anatomy*, 215, 462-71.
- Söhl, G. and Willecke, K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research*, 62, 228-32.
- Solan, J.L. and Lampe, P.D. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711, 154-63.
- Sridharan, S., Simon, L., Meling, D.D., Cyr, D.G., Gutstein, D.E., Fishman, G.I., Guillou, F. and Cooke, P.S. 2007. Proliferation of adult sertoli cells following

- conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biology of Reproduction*, 76, 804-12.
- Srinath, B.R., Wickings, E.J., Witting, C. and Nieschlag, E. 1983. Active immunization with follicle-stimulating hormone for fertility control: a 4 1/2-year study in male rhesus monkeys. *Fertility & Sterility*, 40, 110-7.
- Steger, K. 2001. Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reproduktionsmedizin*, 17, 137-148.
- Steger, K., Tetens, F. and Bergmann, M. 1999. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochemistry of Cell Biology*, 112, 215-20.
- Steinberger, E. 1971. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiological Reviews*, 51, 1-22.
- Stevenson, B.R., Anderson, J.M., Goodenough, D.A. and Mooseker, M.S. 1988. Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *Journal of Cell Biology*, 107, 2401-8.
- Stevenson, B.R. and Keon, B.H. 1998. The tight junction: morphology to molecules. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 14, 89-109.
- Stevenson, B.R. and Paul, D.L. 1989. The molecular constituents of intercellular junctions. *Current Opinion in Cell Biology*, 1, 884-91.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. and Goodenough, D.A. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *Journal of Cell Biology*, 103, 755-66.
- Stumpf, T.T., Wolfe, M.W., Roberson, M.S., Kittok, R.J. and Kinder, J.E. 1993. Season of the year influences concentration and pattern of gonadotropins and testosterone in circulation of the bovine male. *Biology of Reproduction*, 49, 1089-95.
- Su, L., Cheng, C.Y. and Mruk, D.D. 2009. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood-testis barrier. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 2578-87.
- Su, L., Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. 2011. Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *The Journal of endocrinology*, 208, 207-23.
- Suarez-Quian, C.A., Martinez-Garcia, F., Nistal, M. and Regadera, J. 1999. Androgen receptor distribution in adult human testis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 350-8.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251, 1451-5.
- Tan, K.A., De Gendt, K., Atanassova, N., Walker, M., Sharpe, R.M., Saunders, P.T., Denolet, E. and Verhoeven, G. 2005. The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*, 146, 2674-83.
- Tarulli, G.A., Meachem, S.J., Schlatt, S. and Stanton, P.G. 2008. Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult Djungarian hamster in vivo. *Reproduction*, 135, 867-77.
- Thomas, T., Jordan, K., Simek, J., Shao, Q., Jedszko, C., Walton, P. and Laird, D.W. 2005. Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *Journal of Cell Science*, 118, 4451-62.
- Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hulser, D. and Willecke, K. 1989. Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *Journal of Cell Biology*, 108, 1039-51.

- Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A., Martin, G.B., Doyle, A.G. and Walsh, J. 2001. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Journal of Reproduction & Fertility - Supplement*, 57, 255-61.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 285-93.
- Ueno, H. and Mori, H. 1990. Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biology of Reproduction*, 43, 769-76.
- Unwin, P.N. and Ennis, P.D. 1983. Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *Journal of Cell Biology*, 97, 1459-66.
- Unwin, P.N. and Zampighi, G. 1980. Structure of the junction between communicating cells. *Nature*, 283, 545-9.
- Van Itallie, C.M. and Anderson, J.M. 2004. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology*, 19, 331-8.
- Van Itallie, C.M. and Anderson, J.M. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, 68, 403-29.
- VanSlyke, J.K. and Musil, L.S. 2000. Analysis of connexin intracellular transport and assembly. *Methods (Duluth)*, 20, 156-64.
- Vergouwen, R.P., Jacobs, S.G., Huiskamp, R., Davids, J.A. and de Rooij, D.G. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction & Fertility*, 93, 233-43.
- Vickery, B.H., McRae, G.I., Briones, W., Worden, A., Seidenberg, R., Schanbacher, B.D. and Falvo, R. 1984. Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. Suppression, reversibility, and effect of testosterone replacement. *Journal of Andrology*, 5, 28-42.
- Vitale, R., Fawcett, D.W. and Dym, M. 1973. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anatomical Record*, 176, 331-44.
- Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A. and Suarez-Quian, C.A. 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 134, 2307-16.
- Walker, W.H. and Cheng, J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130, 15-28.
- Wang, H., Xiong, W., Chen, Y., Ma, Q., Ma, J., Ge, Y. and Han, D. 2006a. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction*, 132, 485-92.
- Wang, R.S., Yeh, S., Chen, L.M., Lin, H.Y., Zhang, C., Ni, J., Wu, C.C., di Sant'Agnese, P.A., deMesy-Bentley, K.L., Tzeng, C.R. and Chang, C. 2006b. Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology*, 147, 5624-33.
- Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R. and Chang, C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 30, 119-32.
- Weber, J.E. and Russell, L.D. 1987. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy*, 180, 1-24.
- Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V. and Peterson, R.N. 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli

- and Sertoli--germ-cell relationships. *American Journal of Anatomy*, 167, 163-79.
- White, T.W. and Bruzzone, R. 1996. Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 28, 339-50.
- Wiesen, J.F. and Midgley, A.R., Jr. 1994. Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biology of Reproduction*, 50, 336-48.
- Wilbert, D.M., Griffin, J.E. and Wilson, J.D. 1983. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 56, 113-20.
- Willars, G.B., Heding, A., Vrecl, M., Sellar, R., Blumenrohr, M., Nahorski, S.R. and Eidne, K.A. 1999. Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization. *Journal Biological Chemistry*, 274, 30146-53.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U. and Sohl, G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological Chemistry*, 383, 725-37.
- Willecke, K. and Haubrich, S. 1996. Connexin expression systems: to what extent do they reflect the situation in the animal? *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 28, 319-26.
- Wilson, J.D., Griffin, J.E. and George, F.W. 1980. Sexual differentiation: early hormone synthesis and action. *Biology of Reproduction*, 22, 9-17.
- Winkler, L. 2001. *Die Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und Claudin-5 für Claudin-Interaktionen und Tight junction-Strangbildung*. Dr. rer. nat., Freie Universität Berlin.
- Winterhager, E., Pielensticker, N., Freyer, J., Ghanem, A., Schrickel, J.W., Kim, J.S., Behr, R., Grummer, R., Maass, K., Urschel, S., Lewalter, T., Tiemann, K., Simoni, M. and Willecke, K. 2007. Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Developmental Biology*, 7, 26.
- Wistuba, J., Schrod, A., Greve, B., Hodges, J.K., Aslam, H., Weinbauer, G.F. and Luetjens, C.M. 2003. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biology of Reproduction*, 69, 582-91.
- Wong, C.H. and Cheng, C.Y. 2005. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 71, 263-96.
- Wong, E.W., Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. 2008. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 692-708.
- Wong, V. and Russell, L.D. 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: I. Methods, basic configuration, and dimensions. *American Journal of Anatomy*, 167, 143-61.
- Xu, J., McKeehan, K., Matsuzaki, K. and McKeehan, W.L. 1995. Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 6308-13.
- Yamanaka, J., Baker, M., Metcalfe, S. and Hutson, J.M. 1991. Serum levels of Mullerian inhibiting substance in boys with cryptorchidism. *Journal of Pediatric Surgery*, 26, 621-3.

- Yazama, F. 2008. Continual maintenance of the blood-testis barrier during spermatogenesis: the intermediate compartment theory revisited. *Journal of Reproduction & Development*, 54, 299-305.
- Yeager, M. and Nicholson, B.J. 1996. Structure of gap junction intercellular channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 183-92.
- Zhang, L.X., Acevedo, P., Guo, H. and Bertram, J.S. 1995. Upregulation of gap junctional communication and connexin43 gene expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*, 12, 50-8.
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T., Katzenellenbogen, B.S. and Hess, R.A. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*, 23, 870-81.

### C. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei vielen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wehrend für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Sandra Goericke-Pesch, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei allen Fragen und Problemen zu jeder Zeit zur Seite stand. Vielen Dank dafür.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie für Groß- und Kleintier mit tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben und am Gelingen beteiligt waren.

Ich möchte mich weiterhin bei dem Institut für Veterinäranatomie der Justus-Liebig-Universität und hier insbesondere bei Frau Dr. Daniela Fietz für ihren Rat und die Unterstützung bei meinen Versuchen bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Brehm für seine fachlichen Anregungen danken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Herrn Dr. Failing und Frau Sparenberg, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen beiden Freunden und Mitdoktoranden Anne und Sven für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, die konstruktiven Diskussionen und die insgesamt tolle Zeit in den letzten 1 ½ Jahren bedanken. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit euch zusammenzuarbeiten.

Allen meinen Freunden danke ich für die Ausdauer und Geduld mit der sie mich immer wieder aufs Neue motiviert und aufgemuntert haben und mir damit das Anfertigen meiner Doktorarbeit erleichtert haben.

Zuletzt möchte ich mich noch vor allem bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken ohne deren Unterstützung in jeglicher Hinsicht ich nie so weit gekommen wäre und die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen.

Vielen Dank.